

Effekt av trening *in vivo* og *in vitro* på humane skjelettmuskelceller i kultur

Nils Gunnar Løvsletten



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Effekt av trening *in vivo* og *in vitro* på humane skjelettmuskelceller i kultur

Nils Gunnar Løvsletten



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Veiledere:

Professor G. Hege Thoresen

Professor Arild C. Rustan

Stipendiat Jenny Lund

© Nils Gunnar Løvsletten

2015

Effekt av trening *in vivo* og *in vitro* på humane skjelettmuskelceller i kultur

Nils Gunnar Løvsletten

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2014 til mai 2015.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, professor G. Hege Thoresen, professor Arild C. Rustan og stipendiat Jenny Lund for god hjelp, rådgivning, korrekturlesing og støtte gjennom hele masterperioden. Tusen takk til Camilla Stensrud for god opplæring på cellelaben. Takk til alle i «muskelbunten» for god hjelp på lab, korrekturlesing, faglige innspill, godt miljø og lærerike møter. Jeg vil også få takke alle de ansatte i Gydas vei 8 for et hyggelig og inkluderende fellesskap. Takk til alle på masterkontoret for et hyggelig år med mye latter.

Jeg vil takke min familie som hele tiden har støttet og motivert meg. Takk for at dere alltid stiller opp for meg. Takk til Karoline og Robert for god hjelp med korrekturlesing og formatering av oppgaven. Tilslutt vil jeg takke Maja for all støtte, inspirasjon og omtanke du har gitt meg.

Oslo, mai 2015

Nils Gunnar Løvsletten

Abstract

Background: Overweight, obesity and type 2 diabetes (T2D) have become an increasing problem worldwide. Insulin resistance, which means that the body fails to respond to the normal actions of insulin, plays a crucial role in the development of T2D. Physical activity is important to prevent and treat a number of metabolic disorders. In this thesis the effect of exercise on energy metabolism and insulin response has been examined in human skeletal cells isolated from subjects before and after 12 weeks of resistance and endurance training.

Methods: Skeletal muscle cells were isolated from biopsies of *musculus vastus lateralis* obtained from male volunteers before and after a 12-weeks exercise intervention. The exercise intervention included two strength and two endurance sessions per week. The muscle cells were cultured and differentiated into multinucleated myotubes. Insulin response was examined before and after exercise by western immunoblotting, where the levels of phosphorylated protein kinase B (Akt) and insulin receptor substrate 1 (IRS1) were studied. Glycogen synthesis was measured by using radiolabeled D-[^{14}C (U)]glucose. The protein expression of a marker for slow muscle, type 1 muscle fibers (MHC-I), was studied by using western immunoblotting. Myotubes were treated with an *in vitro* model for training, electrical pulse stimulation (EPS), a chronic, low-frequency stimulation (single pulses of 2 ms, 30 V, frequency 1 Hz) during the last 48 hours of the differentiation period, and the expression of genes involved in energy metabolism was measured by using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). In addition, the effect of conditioned media on glucose and fatty acid metabolism in human myotubes was examined by using radiolabeled D-[^{14}C (U)]glucose and [1- ^{14}C]oleic acid.

Results: Participants in the exercise intervention study showed improved insulin sensitivity *in vivo* after exercise, but muscle cells isolated and differentiated into myotubes *in vitro* did not reflect this. There was a tendency to an increased insulin effect on phosphorylation of Akt after exercise, but there was no increased effect of insulin on glycogen synthesis or phosphorylation of IRS1. There were no observed changes in protein expression of MHC-I after exercise. Conditioned media from cells isolated after exercise increased glucose oxidation. Cells from both before and after the exercise intervention had a significant EPS induced increase in the gene expression of carnitine palmitoyltransferase 1b (CPT1b) and a tendency towards an increase of interleukin-6 (IL-6).

Conclusion: Training leads to physiological adaptations *in vivo*. Muscle cells isolated and differentiated to myotubes after an exercise intervention showed that changes in response to exercise *in vivo* can be retained in human myotubes *in vitro*. Training *in vitro* in the form of EPS stimulation affected gene expression in human myotubes. Preliminary data indicate that cellular responsiveness to EPS can be changed after exercise *in vivo*. To draw final conclusions more data is required since myotubes from a limited number of donors was studied in this thesis.

Sammendrag

Bakgrunn: Overvekt, fedme og diabetes type 2 (T2D) er et stadig økende problem i dagens samfunn. Insulinresistens, hvor kroppen ikke reagerer slik den skal på insulin, spiller en viktig rolle i utviklingen av T2D. Fysisk aktivitet er viktig i både forebygging og behandling av en rekke metabolske sykdommer. I denne oppgaven er effekt av trening på energimetabolisme og insulinrespons studert i humane skjelettmuskelceller isolert fra individer før og etter 12 uker med styrke- og utholdenhetstrening.

Metode: Skjelettmuskelceller ble isolert fra biopsier av *musculus vastus lateralis* hos mannlige, frivillige studiedeltakere før og etter en 12 ukers treningsintervensjon. Treningen bestod av to økter med styrke og to økter med utholdenhetstrening hver uke. Muskelcellene ble dyrket opp og differensiert til flerkjernede myotuber. Insulinrespons før og etter trening ble undersøkt med western immunoblotting, hvor nivåene av fosforylert protein kinase B (Akt) og insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1) ble studert. Glykogensyntese ble målt ved bruk av radiomerket D-[¹⁴C(U)]glukose. Proteinuttrykk av markøren for langsomme muskelfibre, muskelfibertype 1 (MHC-I), ble studert med western immunoblotting. Myotuber ble behandlet med en *in vitro*-modell for trening, elektrisk pulsstimulering (EPS), en kronisk, lavfrekvent stimulering (enkeltpulser 2 ms, 30 V, frekvens 1 Hz) de siste 48 timene av differensieringsperioden og ekspresjonen av gener involvert i energimetabolismen ble målt ved bruk av kvantitativ polymerase-kjedereaksjon (qPCR). I tillegg ble effekten av kondisjonerte medier på glukose- og fettsyremetabolismen i humane myotuber undersøkt ved å benytte henholdsvis radiomerket D-[¹⁴C(U)]glukose og [1-¹⁴C]oljesyre.

Resultater: Deltakerne i treningsstudien fikk økt insulinfølsomhet *in vivo* etter trening, men muskelceller isolert og differensiert til myotuber *in vitro* etter treningsintervensjonen reflekterte ikke dette. Det var en tendens til økt insulinindusert effekt på fosforylering av Akt etter treningsintervensjonen, men det var ingen økt insulinindusert glykogensyntese eller fosforylering av IRS1. Det ble ikke observert noen endring i proteinuttrykk av MHC-I etter treningsintervensjonen. Kondisjonerte medier fra celler isolert etter trening ga økt glukoseoksidasjon. Celler fra både før og etter treningsintervensjonen hadde en signifikant EPS-indusert økning i genekspressjon av karnitin palmitoyltransferase 1b (CPT1b) og en tendens til økning av interleukin-6 (IL-6).

Konklusjon: Trening fører til fysiologiske tilpasninger *in vivo*. Muskelceller isolert og differensiert til myotuber etter treningsintervensjonen viste at endringer som følge av trening *in vivo* kan bevares i humane myotuber *in vitro*. Trening *in vitro* i form av EPS-stimulering påvirket genekspresjonen i humane myotuber. Preliminære data tyder på at cellenes responsivitet til EPS kan være endret etter trening *in vivo*. For å trekke endelige konklusjoner kreves mer data ettersom myotuber fra kun et begrenset antall donorer ble studert i denne masteroppgaven.

Forkortelser

36B4	Syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0
ADP	Adenosin difosfat
Akt	Protein kinase B
AMP	Adenosin monofosfat protein
AMPK	AMP-protein kinase
AS160	Akt-substrat 160
ATP	Adenosin trifosfat
BCA	“Bicinchoninic acid”
BSA	Bovint serumalbumin
CA	Celleassosiert radioaktivitet
cDNA	Komplementært deoksyribonukleinsyre
CO ₂	Karbondioksid
CoA	Koenzym A
CPT	Karnitin palmitoyltransferase
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimetylsulfoksid
EPS	Elektrisk pulsstimulering
ET	Etter treningsintervensjonen
FABP	Fettsyrebindende protein
FAT/CD36	Fettsyretranslokase
FATP	Fettsyre transportprotein
FCS	Føtalt kalveserum
FFA	Frie fettsyrer
FSO	Fettsyreoksidasjon
FT	Før treningsintervensjonen
G1P	Glukose-1-fosfat
G6P	Glukose-6-fosfat
GIR	Glukoseinfusjonshastighet
GLUT	Glukosetransportør
GS	Glykogensyntase
GSK3	Glykogensyntase kinase-3
HDL	«High density» lipoprotein

IDF	«International Diabetes Federation»
IGF	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
IMCL	Intramycellulære lipider
IR	Insulinreseptor
IRS	Insulinreseptorsubstrat
KMI	Kroppsmasseindeks
LDL	«Low density» lipoprotein
MAPKs	Mitogen-aktiverte proteinkinaser
mRNA	Messenger ribonukleinsyre
mTORC2	«Mammalian target of rapamycin complexed with Rictor
MYH7	Myosin tung kjede-gen
PBS	Fosfatbufret saltvann
PDC	Pyruvat dehydrogenase kompleks
PDK	Pyruvat dehydrogenase kinase
PDK1	3-fosfoinositide-avhengig protein kinase 1
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinase
PIP2	Fosfatidylinositol 4,5-bifosfat
PIP3	Fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat
PKC	Protein kinase C
qPCR	Kvantitativ polymerase-kjedereaksjon
RNA	Ribonukleinsyre
SDS	Natrium dodecylsulfat
SEM	Standardfeil
Ser	Serin
T2D	Type 2 diabetes
Tre	Treonin
TNF α	Tumor nekrose faktor α
Tyr	Tyrosin
UDP	Uridindifosfat
VLDL	“Very low density” lipoprotein
VO _{2max}	Maksimalt oksygenopptak
WHO	Verdens helseorganisasjon

Innholdsfortegnelse

Forord	II
Abstract.....	III
Sammendrag.....	V
Forkortelser	VII
Innholdsfortegnelse.....	IX
1 Innledning	1
1.1 Overvekt og fedme	1
1.2 Metabolsk syndrom	2
1.3 Type 2-diabetes.....	3
1.4 Insulins rolle i reguleringen av energimetabolismen	5
1.4.1 Insulinsignalveien - effekt på glukosehomeostase i skjelettmuskel	6
1.4.2 Insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1)	7
1.4.3 Insulinresistens.....	8
1.5 Skjelettmusklens oppbygning og struktur	9
1.5.1 Muskelfibertype	10
1.5.2 Modell for skjelettmuskelceller <i>in vitro</i>	10
1.6 Effekt av trening på skjelettmuskel.....	11
1.6.1 Elektrisk pulsstimulering – trening <i>in vitro</i>	11
1.7 Skjelettmuskel som et endokrint organ	12
1.7.1 Interleukin-6 (IL-6)	12
1.8 Energimetabolismen i skjelettmuskel	13
1.8.1 Glukosemetabolismen.....	13
1.8.2 Fettsyremetabolismen	15
1.8.3 Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel	16
1.9 Mål for oppgaven	17
2 Materialer og metode	18
2.1 Materialer	18
2.1.1 Kjemikalier og reagenser	18
2.1.2 Utstyr.....	19
2.2 Donorkarakteristika	20

2.2.1	Donorkarakteristika del 1	20
2.2.2	Styrketrening.....	20
2.2.3	Utholdenhetstrening	21
2.2.4	Effekt av treningsintervensjonen	22
2.2.5	Donorkarakteristika del 2.....	22
2.3	Celledyrking	23
2.3.1	Opprettelse av cellebank	23
2.3.2	Utsåing	23
2.3.3	Proliferasjon og differensiering	23
2.4	Elektrisk pulsstimulering (EPS) av myotuber	24
2.5	Glykogensyntese.....	25
2.5.1	Høsting av celler til glykogensyntese	25
2.5.2	Glykogensyntese	25
2.5.3	Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit for proteinmåling.....	25
2.6	Westernblotting.....	26
2.6.1	Utsåing til western	26
2.6.2	Høsting	26
2.6.3	Gelelektroforese	27
2.6.4	Blotting	27
2.6.5	Blokkering og påsetting av antistoff	28
2.6.6	Fremkalling	28
2.7	Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR)	28
2.7.1	Utsåing og høsting av celler til qPCR.....	28
2.7.2	Isolering av RNA	29
2.7.3	Kvantifisering av RNA-konsentrasjonen	29
2.7.4	Syntese av cDNA	29
2.7.5	qPCR	30
2.8	Substratoksidasjonsmetoden	31
2.8.1	Substratoksidasjonsforsøket.....	32
2.8.2	Celleassosiert radioaktivitet	33
2.8.3	Bradford's metode for proteinmåling.....	33
2.9	Statistikk	33
3	Resultater	34

3.1	Effekter av trening <i>in vivo</i> på insulinsensitivitet <i>in vitro</i>	34
3.1.1	Effekt av trening og insulin på fosforylering av Akt og IRS1	34
3.1.2	Effekt av trening og insulin på glykogensyntese	36
3.2	Effekt av trening <i>in vivo</i> på proteinuttrykk av MHC-I (type 1-fibre) <i>in vitro</i> .	37
3.3	Effekt av trening <i>in vitro</i> på genekspresjon	39
3.4	Effekt av behandling med kondisjonert medium på oljesyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber	41
4	Diskusjon	45
4.1	Treningsintervensjonen	45
4.2	Fra satellittceller til humane myotuber – modell for skjelettmuskelceller <i>in vitro</i>	45
4.3	Effekt av trening på proteinuttrykk av type 1-fibre	47
4.4	Effekt av trening <i>in vitro</i> på genekspresjonen	47
4.5	Effekter av trening på insulinsensitivitet	48
4.6	Effekt av kondisjonert medium på oljesyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber	50
4.7	Veien videre	52
5	Konklusjon	53
	Litteraturliste	54
	Appendiks	59

1 Innledning

1.1 Overvekt og fedme

Overvekt og fedme defineres som tilstander med unormal eller overflødig akkumulering av fett på kroppen, noe gir en økt risiko for å utvikle flere sykdommer. I 2014 estimerte Verdens Helseorganisasjon (WHO) at det på verdensbasis var 1,9 milliarder voksne (≥ 18 år) som var overvektige, hvorav 600 millioner led av fedme. Prevalensen av fedme har mer enn doblet seg siden 1980. I dag er overvekt og fedme et økende problem, også i utviklingsland [1]. Forekomsten av fedme varierer fra nasjon til nasjon; alt fra Kina, Japan og deler av Afrika hvor forekomsten er under 5 %, til deler av Samoa hvor tallet er 75 % [2]. I Norge lider én av fem av fedme [3].

Det brukes flere ulike parametere for å vurdere kroppsvekt og fettfordeling i forhold til helse. Kroppsmasseindeks (KMI) er den enkleste og mest brukte metoden. KMI defineres som vekten i kilogram dividert med kvadratet av høyden i meter (kg/m^2). WHO klassifiserer overvekt som $\text{KMI} \geq 25$, og fedme som $\text{KMI} \geq 30$. En forhøyet KMI-verdi gir økt risiko for utvikling av kardiovaskulær sykdom, insulinresistens og type 2-diabetes (T2D), slitasjegikt og ulike kreftformer [1].

Tabell 1.1: WHO's klassifisering av KMI. KMI, kroppsmasseindeks. Modifisert fra [4].

KMI (kg/m^2)	Vektklassifisering
18-25	Normalvekt
≥ 25	Overvektig
≥ 30	Fedme
30-34,9	Fedme grad 1
35-39,9	Fedme grad 2
≥ 40	Fedme grad 3

Utvikling av overvekt og fedme skyldes en ubalanse mellom energiinntak og energiforbruk [1]. Forstyrrelser i denne energibalansen skyldes et samspill mellom arv og miljø [3]. Behandling av overvekt og fedme tilrettelegges den enkelte og tar sikte på vektreduksjon. I dag finnes det ett registrert legemiddel mot fedme på markedet i Norge, Orlistat (Xenical®) [3]. Orlistat er en pankreaslipasehemmer som reduserer spaltningen av triglyserider i tarmen.

Dette fører til at rundt 30 % av triglyseridene ikke blir absorbert, men skilles ut av kroppen. Orlistat kan gi en vektreduksjon på 2-5 kg i forhold til placebo når det i tillegg følges råd for kosthold og fysisk aktivitet [5]. Tall fra reseptregisteret viser at rundt 7000 nordmenn brukte dette legemidlet i 2014 [6].

I motsetning til de fleste andre vev evner fettvev å ekspandere. Adipocytene kan variere i størrelse fra 20 μm til 100 μm i diameter. Ekspansjon av fettvevet skyldes ikke bare økt adipocytstørrelse som følge av triglyseridakkumulering, men også en økning i antall adipocytter [7]. Ved overvekt og fedme vil lagringskapasiteten til fettvevet overskrides og lipider akkumuleres i andre organer. Dette kan forårsake insulinresistens [8, 9]. Fettvev er et stort endokrint organ som skiller ut bioaktive peptider kalt adipokiner. Eksempler på slike adipokiner er leptin, tumor nekrosefaktor α (TNF α), interleukin 6 (IL-6) og adiponektin. Leptin reduserer intracellulære lipidnivåer og bedrer insulinsensitiviteten i muskel, lever og pankreas. Økte nivåer av TNF α og IL-6 er derimot satt i sammenheng med utvikling av insulinresistens [10].

1.2 Metabolsk syndrom

Metabolsk syndrom har i de siste tiårene blitt en stadig større helseutfordring globalt [11]. Tilstanden karakteriseres av forstyrrelser i en rekke metabolske faktorer som gir en økt risiko for utvikling av hjerte- og karsykdommer, samt T2D. Fedme, spesielt abdominal fedme, og insulinresistens er de to viktigste bidragsyterne for utviklingen av tilstanden [12]. ”The International Diabetes Federation” (IDF) har estimert at opptil 25 % av verdens befolkning har metabolsk syndrom [13]. Det finnes flere ulike definisjoner av metabolsk syndrom. IDF sin definisjon tar utgangspunkt i en sentral overvekt med livvidde på ≥ 94 cm for menn og ≥ 80 cm for kvinner (europeisk etnisitet). I tillegg skal to av følgende tilstander være tilstede [14]:

- Hypertensjon ($\geq 130/85$ mmHg), eller initiert behandling for denne tilstanden.
- Triglyserider $\geq 1,7$ mmol/l, eller initiert behandling for denne tilstanden.
- Redusert high-density lipoprotein (HDL) kolesterolnivå ($< 1,03$ mmol/l for menn og $< 1,29$ mmol/l for kvinner), eller initiert behandling for denne tilstanden.
- Fastende plasma-glukose $>5,6$ mmol/l, eller tidligere diagnostisert med T2D.

Risikoen for å utvikle kardiovaskulær sykdom og T2D er henholdsvis tre og fem ganger økt hos de med metabolsk syndrom [13]. Det er derfor viktig å starte forebyggende behandling når tilstanden oppdages. Livsstilsendringer som økt fysisk aktivitet og endret kosthold kan gi en stor helsegevinst i form av vektreduksjon. Vektreduksjon har en gunstig effekt på alle de metabolske risikofaktorene. På sikt kan det bli nødvendig å behandle med legemidler. Medikamentell behandling tar sikte på å behandle hver av risikofaktorene separat. Aktuelle legemiddelgrupper er kolesterolsenkende, blodtrykkssenkende, antidiabetika, antitrombotiske midler og legemidler mot fedme [12].

1.3 Type 2-diabetes

T2D er en kronisk sykdom hvor insulinresistens og relativ insulinmangel spiller en viktig rolle. T2D utvikler seg gradvis over tid. Arvelige forhold, ofte i kombinasjon med overvekt og lite fysisk aktivitet, er bakenforliggende årsaker til sykdommen [15]. Insulinresistens kan være tilstede i flere år før sykdommen inntreffer. Under slike forhold kan β -cellene i pankreas opprettholde normal blodglukose ved å øke sekresjonen av insulin. Først når β -cellene ikke klarer å kompensere for den manglende insulineffekten vil T2D forekomme. Svekket funksjon av β -cellene er tilslutt en utløsende årsak til sykdommen [16].

I dag er T2D svært utbredt og det ble i 2014 estimert at 9 % av verdens voksne befolkning lider av diabetes, hvorav 90 % har T2D. Sykdommen opptreer også i økende grad hos barn og unge [17]. I Norge øker forekomsten av T2D, og tall fra reseptregisteret viser at rundt 170 000 nordmenn brukte blodglukosesenkende medikamenter i 2013 [18]. Likevel antas det at antallet med T2D kan dobles, fordi mange går udiagnostisert med sykdommen [15].

De generelle behandlingsmålene i de nasjonale retningslinjene for behandling av T2D anbefaler en vektnedgang på 5-10 % (ved overvekt), minst 30 minutter fysisk aktivitet daglig, HbA_{1c} -verdier $\leq 7,0$ %, blodtrykk $< 135/80$ mmHg, fastende blodglukose 4-6 mmol/l, ikke-fastende blodglukose 4-10 mmol/l og LDL-kolesterol $\leq 2,5$ mmol/l ($\leq 1,8$ mmol/l ved kjent hjerte-/karsykdom). Hensikten med disse behandlingsmålene er å forhindre eller redusere risikoen for å utvikle senkomplikasjoner, samtidig som behandlingsmålene tar sikte på å gi en best mulig livskvalitet. Det er vist at enkle livsstilsendringer kan være effektive for å forhindre eller utsette sykdommen. WHO har anslått at 90 % av T2D kan forebygges med endring i kosthold, fysisk aktivitet og røykevaner. Ved påvist T2D er slike livsstilsendringer

ofte første tiltak for å normalisere blodglukosen. Dersom det ikke oppnås ønsket effekt er perorale antidiabetika indisert [15].

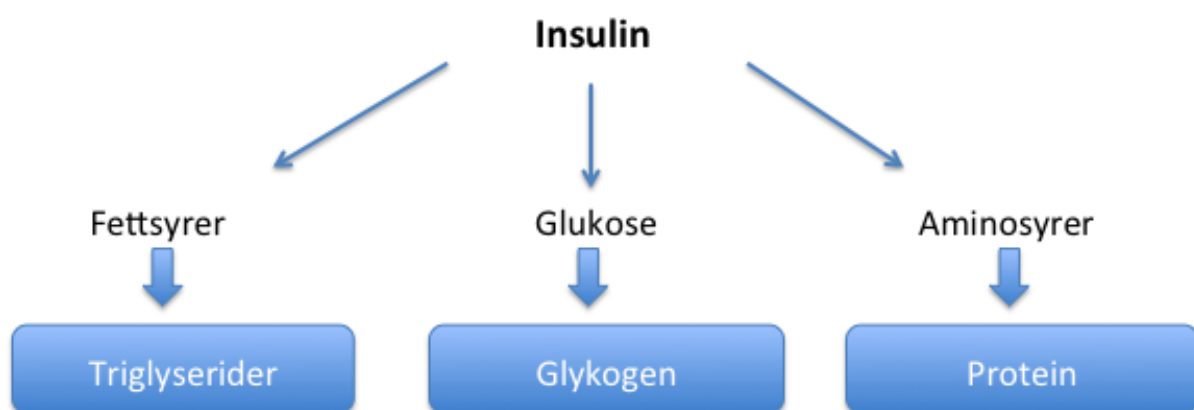
Det finnes mange perorale antidiabetika på markedet. I de nasjonale retningslinjene for behandling av T2D er metformin (Glucophage®) førstevalget. Hvis behandlingsmålene ikke oppnås med metformin kan supplerende behandling i form av et sulfonylureapreparat eller insulin forsøkes. Andre medikamenter som også kan benyttes omfatter glitazoner, glinider og glipitiner [15]. Metformin er et biguanid med god effekt på hyperglykemi. Virkningsmekanismen til metformin er ikke fullstendig klarlagt, men det er godt kjent at metformin hemmer produksjonen av glukose i lever samtidig som insulinsensitiviteten i skjelettmuskel forbedres. I tillegg er metformin gunstig siden medikamentet kan redusere appetitten og føre til vektnedgang. Nylig er effekten av metformin satt i forbindelse med aktivering av adenosin monofosfat (AMP) protein kinase (AMPK) [16]. AMPK virker som en energisensor og er viktig for å opprettholde energihomeostase i cellene [19]. Sulfonylureapreparater var de første perorale preparatene mot T2D som kom på markedet. Disse preparatene øker insulinnivåene ved at de binder seg til reseptorer på β -cellene i pankreas og medierer insulinsekresjon. Den vanligste bivirkningen til disse medikamentene er hypoglykemi [16].

Risikofaktorene for å utvikle T2D kan deles inn i modifiserbare og ikke-modifiserbare risikofaktorer. De ikke-modifiserbare risikofaktorene er etnisitet, genetikk, alder og kjønn, og de modifiserbare risikofaktorene omfatter fedme, fysisk inaktivitet, kosthold og samlingen av tilstander kalt metabolsk syndrom. Rundt 75-80 % av de som rammes av T2D dør av kardiovaskulær sykdom [20]. I tillegg til økt risiko for kardiovaskulær sykdom medfører T2D også en risiko for å utvikle andre senkomplikasjoner. Dette gjelder spesielt de med dårlig regulert diabetes. Diabetisk nefropati, retinopati og nevropati er aktuelle komplikasjoner som i stor grad skyldes mikrovaskulære og makrovaskulære skader i blodkar og nervevev [21].

1.4 Insulins rolle i reguleringen av energimetabolismen

Insulin er et peptidhormon som produseres av β -cellene i pankreas. Insulinets hovedoppgave er å øke opptak og lagring av glukose, aminosyrer og fettsyrer etter måltid (se figur 1.1). Sekresjon av insulin reguleres av en rekke faktorer, men viktigst er glukosekonsentrasjonen i blodet. Etter måltid stimuleres insulinsekresjonen ved at glukosekonsentrasjonen i blodet øker. Sekresjon av insulin skjer i to faser. I første fase frigjøres lagret insulin, noe som bidrar til en økt sekresjon av insulin i 5-15 minutter. Videre regulerer β -cellene i pankreas nydanning og sekresjon av insulin basert på glukosekonsentrasjon i blodet. Insulin har en halveringstid på 5-8 minutter i plasma før det brytes ned i lever eller nyrene [22].

Insulin er et anabolt hormon med effekt på den intermediære metabolismen og utøver sin effekt i både lever, muskel og fettvev. I leveren påvirker insulin glukosemetabolismen og fører til økt glykogensyntese slik at de hepatiske glykogenlagrene øker. I muskel stimulerer insulin til økt glukoseopptak ved å rekruttere glukosetransportør 4 (GLUT4) til cellemembranen, samtidig som glykogensyntese og glykolyse stimuleres. Økt glukoseopptak i fettvev skyldes også en økt GLUT4 translokasjon til cellemembranen (se avsnitt 1.8.1 – for mer informasjon om GLUT4). Insulin stimulerer i tillegg opptaket av aminosyrer i muskel noe som bidrar til økt proteinsyntese. I fettvev og lever øker syntesen av fettsyrer og triglyserider, samtidig som lipolyse inhiberes [2]. Se en forenklet oversikt over virkningene av insulin i figur 1.1.

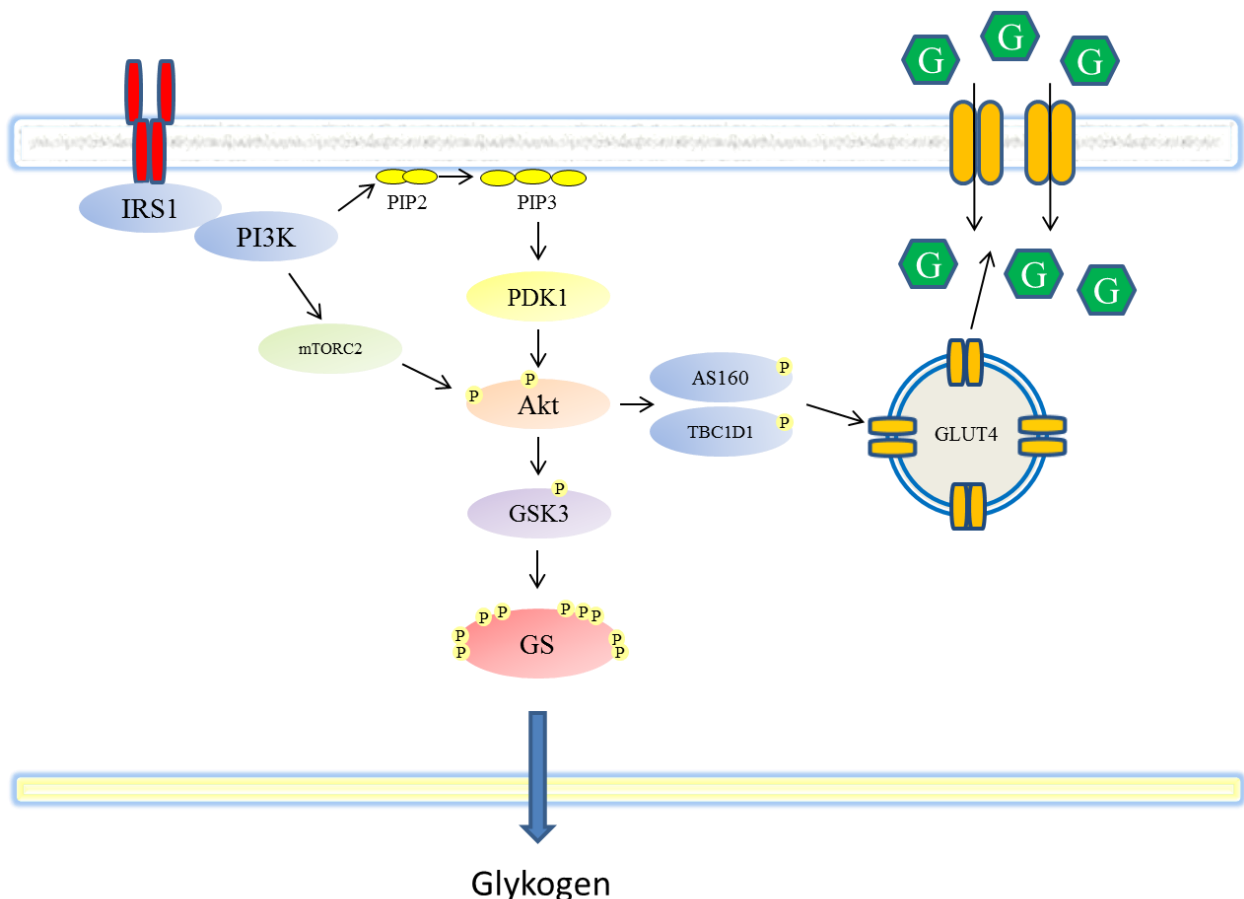


Figur 1.1 Virkningene av insulin. Insulin fører til økt opptak av fettsyrer, glukose og aminosyrer. Dette gir grunnlag for økt syntese av triglyserider, glykogen og proteiner.

1.4.1 Insulinsignalveien - effekt på glukosehomeostase i skjelettmuskel

For å kunne utøve sin effekt må insulin binde seg til en spesifikk reseptor kalt insulinreseptoren (IR). IR tilhører en gruppe reseptorer som aktiverer tyrosinkinaser og er et transmembranprotein som består av to α - og to β -subenheter. α -subenheten fungerer som et allosterisk enzym ved å inhibere tyrosinkinaseaktiviteten til β -subenheten. Når insulin binder seg til α -subenheten fører det til en konformasjonsendring og aktivering av kinaseaktiviteten på β -subenheten. Dette fører til en autofosforylering flere steder og er første ledd i aktiveringen av IR [23, 24]. Flere substrater rekrutteres og fosforyleres, deriblant insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1). IRS rekrutterer andre nedstrøms signalproteiner som bidrar til aktivering av RAS \rightarrow mitogen-aktiverte proteinkinaser (MAPKs) og fosfatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalveiene [24]. Aktiveringen av PI3K-signalveien er ansvarlig for de fleste metabolske effektene av insulin [24, 25], og er den som vil bli beskrevet videre.

I skjelettmuskel stimulerer insulin til økt glukoseopptak og økt lagring av glukose i form av glykogen. Figur 1.2 viser en forenklet versjon av PI3K-signalveien. Som beskrevet over blir PI3K rekruttert og aktivert av IRS1. Dette katalyserer dannelsen av fosfatidylinositol 3,4,5-trifosfat (PIP3), en viktig ”second messenger” som videre aktiverer 3-fosfoinositide-avhengig protein kinase 1 (PDK1). PDK1 fosforylerer protein kinase B (Akt) på treonin³⁰⁸ (Tre³⁰⁸). Samtidig må ”mammalian target of rapamycin complexed with Rictor” (mTORC2) fosforylere Akt på serin⁴⁷³ (Ser⁴⁷³) for å oppnå maksimal aktivering av Akt. Akt er et viktig protein i signalveien og medierer videre en fosforylering av Akt-substrat 160 (AS160) og TBC1D1. Dette resulterer i en translokasjon av GLUT4 til cellemembranen, noe som gir økt glukoseopptak. I tillegg induseres glykogensyntese ved at Akt inhiberer glykogensyntase kinase-3 (GSK3) slik at glykogensyntase (GS) aktiveres [26]. GS katalyserer det siste trinnet i glykogensyntesen som er omdannelse av UDP-glukose til glykogen [27].



Figur 1.2: En forenklet illustrasjon av insulin signalveien som regulerer glukosetransport og glykogensyntese i skjelettmuskel. Insulin aktiverer Akt ved fosforylering to steder. Videre fører dette til en fosforylering av AS160 og TBC1D1, og translokasjon av GLUT4 til cellemembranen. Samtidig fosforyleres GSK3, aktiviteten til GSK3 inhiberes og fører til defosforylering og aktivering av GS. AS160, akt-substrat 160; G, glukose; GS, glykogensyntase; GSK3, glykogensyntase kinase-3; IRS1, insulinreseptorsubstrat 1; mTORC2, "mammalian target of rapamycin complexed with Rictor"; PDK1, 3-fosfoinositid-avhengig proteinkinase 1; PI3K, fosfatidylinositol 3-kinase; PIP2, fosfatidylinositol 4,5-bifosfat; PIP3, fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfat. Modifisert fra [26].

1.4.2 Insulinreseptorsubstrat 1 (IRS1)

IRS-proteinene viderefører signaler fra insulin- og IGF-1 (insulin-like growth factor-1)-reseptorene for å fremkalle en cellulær respons. IRS1 var det første medlemmet av IRS-familien som ble identifisert hos mennesker, hvor senere IRS2 og IRS4 er blitt identifisert [28]. I de fleste celler er IRS1 og IRS2 de viktigste mediatorene i regulering av glukosemetabolismen. IRS1 og IRS2 medierer de metabolske effektene til insulin ved å aktivere serin/treonin-fosforyleringssetene [29].

For å se på betydningen av IRS1 og IRS2 utførte Long *et al.* en studie hvor det ble undersøkt "knockout" av IRS1 og IRS2 i mus. Her ble det sett at insulin-indusert fosforylering av Akt

var signifikant (50 %) redusert der IRS1 var fjernet. Det ble derfor slått fast at IRS1 spiller en viktigere rolle enn IRS2 i aktiveringen av Akt under insulin-stimulerte forhold [30].

1.4.3 Insulinresistens

Insulinresistens er definert som en svekket insulinrespons i målorganer som skjelettmuskel, fettvev og lever. Tilstanden er vanlig å se hos personer med T2D og fedme [23]. Ved insulinresistens er insulinstimulerte prosesser redusert, slik som insulinstimulert glukoseopptak i skjelettmuskel. I tillegg blir den antilipolytiske effekten til insulin redusert. Dette fører til kronisk høye nivåer av frie fettsyrer i plasma, noe som spiller en sentral rolle i utviklingen av insulinresistens [31]. Videre resulterer de høye nivåene av frie fettsyrer til økt glukoneogenese, triglyserid-, VLDL- og LDL-syntese i lever [32].

Fedme, spesielt abdominal fedme, er forbundet med økt risiko for å utvikle insulinresistens. Dette skyldes at abdominal fedme er resistent mot de antilipolytiske effektene til insulin, noe som bidrar til økt frigjøring av frie fettsyrer fra fettvevet [8]. For høyt nivå av frie fettsyrer kan føre til akkumulering av intracellulære lipider. Dette skyldes at lagringskapasiteten til fettvevet overskrides og som en konsekvens vil lipider akkumuleres ektopisk i andre vev [8, 9]. Akkumulering av lipider i skjelettmuskel, lever og pankreas kan forårsake insulinresistens [8]. I skjelettmuskel vil en slik ektopisk lipidakkumuleringen kunne føre til lipotoksisitet ved at lipidmetabolitter innvirker negativt på insulinsignaleren [33]. Krssak *et al.* målte intramyocellulære lipidnivåer i skjelettmuskel ved bruk av kjernemagnetisk resonansspektroskopi. Resultatene viste en negativ korrelasjon mellom intramyocellulære lipidnivåer og insulinsensitivitet [34].

Det er flere mekanismer som potensielt kan føre til insulinresistens i skjelettmuskel. Høye nivåer av frie fettsyrer bidrar til intracellulær akkumulering av fettsyrederivater som diacylglyserol (DAG) og ceramid [32, 33, 35]. DAG kan aktivere flere ulike serin-kinaser som virker negativt på insulinsignaleren. En av disse serin-kinasene er protein kinase C θ (PKC θ). PKC θ fosforylerer Ser³⁰⁷ på IRS1 noe som fører til en svekket insulinsignaleren [33, 35]. I tillegg kan frie fettsyrer aktivere pro-inflammatoriske signalveier og bidra til utvikling av en lavere grad av systemisk inflammatorisk respons. Foruten inflammatorisk respons via toll-like reseptorer kan PKC θ aktivere «nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells» (NF- κ B) som regulerer uttrykket av flere inflammatoriske mediatorer

som IL-6. Høye nivåer av IL-6 korrelerer sterkt med insulinresistens og T2D [35]. Et annet lipidderivat, ceramid, kan hemme aktiveringen av Akt gjennom ulike mekanismer, og dermed føre til svekket insulinrespons [33].

1.5 Skjelettmusklens oppbygning og struktur

Skjelettmuskulatur består av rundt 600 separate muskler og utgjør ca. 45 % av kroppsvekten hos en voksen person. Hver muskel består av muskelceller, bindevev, blodårer og nerver. Skjelettmuskelcellene dannes under fosterutviklingen ved at myoblaste (embryonale celler) fusjonerer til flerkjernede muskelceller (myotuber). Etter fødsel er nydanning av muskelceller liten. For videre vekst øker skjelettmuskelens volum ved at størrelsen på hver muskelfiber øker. Ferdig utviklede muskelfibre har en diameter på rundt 0,01-0,1 mm og vanligvis en lengde på noen få centimeter [22].

Muskelfibrene er omgitt av en bindevevshinne og flere slike muskelfibre danner muskelfiberbunter. Selve muskelen består av flere muskelfiberbunter og er omsluttet av en grov bindevevshinne. Skjelettmuskulatur betegnes som tverrstripet muskulatur på bakgrunn av hvordan mikrofilamentene aktin og myosin danner et repeterende mønster av lyse og mørke bånd på tvers av muskelfibrene [22].

Myofibriller er tynne, sylindriske strukturer som strekker seg gjennom muskelfiberen og utgjør rundt 80 % av muskelfibrenes masse. Myofibrillene består i hovedsak av to typer myofilamenter, bygd opp av proteinene aktin og myosin. Myofilamentene er ordnet i et gjentakende mønster langs myofibrillene. Sarkomeren er den minste enheten i mønsteret og består av to aktinfilament og et myosinfilament. I de parallelle myofibrillene ligger sarkomerene på linje og gir opphav til skjelettmuskulaturens tverrstripete utseende. Under muskelkontraksjon forkortes sarkomerene ved at aktin- og myosinfilamentene forskyves i forhold til hverandre og overlappingen øker. Myosinhodene binder seg til aktin og bøyer seg mot midten av myosinfilamentet før de slipper taket og retter seg opp igjen. I hver syklus hydrolyserer myosinhodet ATP til ADP. Hele prosessen gjentas flere ganger. Kontraksjonen i skjelettmuskulatur er viljestyrt og reguleres av det somatisk motoriske nervesystemet [22].

1.5.1 Muskelfibertype

For å kunne takle de mange aktivitetene som kreves av human skjelettmuskulatur har muskelcellene ulike egenskaper. Det er store forskjeller på hvor raskt myosin kan spalte ATP og det legger grunnlaget for hvor raskt en muskelfiber kan kontrahere. Ulik ATPase-aktivitet i de forskjellige isoformene av myosin er bakgrunnen for denne variasjonen. Fra et metabolsk perspektiv er det et viktig skille i hvilken grad muskelfibre er spesialisert på aerob eller anaerob produksjon av ATP. Muskelfibre som danner ATP ved oksidativ fosforylering kalles oksidative fibre, mens fibre som produserer ATP ved glykolyse kalles glykolytiske fibre [22]. I human skjelettmuskulatur finner vi tre ulike fibertyper, de langsomme oksidative fibre (type I), de raske oksidative fibre (type IIa) og de raske glykolytiske fibre (IIx), med de respektive genene MYH7, MYH2 og MYH1 [36]. Type I fibre har lav kontraksjonshastighet, men er svært utholdende. Type IIa og IIx har høy kontraksjonshastighet, men er middels til lite utholdende. Typiske oppgaver for de ulike fibertypene er henholdsvis å sikre kroppsstilling (type I), gå/løpe (type IIa) eller hoppe/kaste (type IIx) [22].

Studier tyder på at de ulike muskelfibre kan vise kvantitative forskjeller i forbindelse med insulin-mediert glukosemetabolismen. Det er vist en positiv korrelasjon mellom mengde type I-fibre i muskel og insulinsensitivitet i kroppen [37]. I en studie utført av Albers *et al.* ble fibertyper fra biopsier av *musculus vastus lateralis* isolert. Biopsiene kom opprinnelig enten fra tynne, overvektige eller individer som led av T2D. I denne studien ble forskjeller mellom fibertypene studert, og resultatene viste at type-I fibre hadde et høyere proteinnivå av insulin reseptor β , hexokinase II, GLUT4 og elektrontransportkjede kompleks II. Basert på disse funnene ble det konkludert med at enzymatisk kapasitet for glukoseopptak, fosforylering og oksidasjon, samt glykogensyntese er høyere i type I-fibre sammenlignet med type II-fibre [37].

1.5.2 Modell for skjelettmuskelceller *in vitro*

Satellittceller ble første gang beskrevet i 1961 på bakgrunn av cellenes morfologi og lokalisering [38]. Satellittceller er stamceller i skjelettmuskulaturen og er lokalisert mellom muskelcellemembranen og basalmembranen [39]. I voksen skjelettmuskulatur er disse cellene vanligvis mitotisk passive, men kan aktiveres til prolifererende myoblaster ved muskelskade eller muskelvekst og differensiere til nye myotuber. Cellene kan isoleres fra

muskelbiopsier og dyrkes *in vitro*. Sammenlignet med myoblaster ligner myotuber mer på proteinekspresjonsmønsteret som uttrykkes i skjelettmuskel *in vivo* og er derfor foretrukket å gjøre forsøk på. Humane myotuber dyrket opp fra satellittceller gir en god forutsetning for å kunne studere glukose- og fettsyremetabolismen i skjelettmuskel *in vitro* [36].

1.6 Effekt av trening på skjelettmuskel

Opprettholdelse av utholdenhet og styrke gjennom fysisk aktivitet kan være med å forhindre utviklingen av kroniske sykdommer relatert til metabolsk dysfunksjon. Repeterende episoder av muskelkontraksjon stimulerer til fysiologiske tilpasninger i skjelettmuskel. Trening fører til endring i proteinuttrykk og aktivitet av enzymer som kan indusere eller hemme spesifikke signalveier som regulerer transkripsjon og translasjon, samt genekspressjonen [40]. Utholdenhetstrening øker antall mitokondrier og bidrar til en forbedret oksidativ kapasitet [41]. Richter *et al.* viste at trening forbedret insulinsensitiviteten i skjelettmuskel [42].

Muskelkontraksjoner påvirker glukosemetabolismen og fører til økt glukoseopptaket ved GLUT4-translokasjonen til cellemembranen (se avsnitt 1.8.1) [43]. Det er sett at trening fører til økt ekspresjonen av GLUT4 etter kun få dager med trening [44]. Den oksidative kapasiteten til skjelettmuskel er høyere i trente individer. Trening fører til en forbedret β -oksidasjon og et høyere innhold av intramyocellulære lipider (IMCL) i skjelettmuskel. Atleter viser en høyere oksidativ kapasitet i forbindelse med økt mengde IMCL [45], mens høye nivåer av IMCL hos utrente individer er assosiert med insulinresistens. Dette er kjent som atletparadokset [46]. Under muskelkontraksjon er det vist signifikant økte nivåer av IL-6, som kan ha innvirkning på glukose og fettsyremetabolismen (se avsnitt 1.7.1) [47, 48].

1.6.1 Elektrisk pulsstimulering – trening *in vitro*

Elektrisk pulsstimulering er en metode for å studere effekter av trening *in vitro* på humane myotuber. Denne modellen er utviklet av Nikolić *et al.* for å se på endringer i metabolske og cellulære prosesser som følge av muskelkontraksjon [49]. I metoden utsettes de dyrkede cellene for lavfrekvent elektrisk stimulering noe som fører til kontraksjon av myotubene. Nikolić *et al.* viste at cellekulturer behandlet med EPS hadde funksjonelle endringer i form av forbedret fettsyreoksidasjon og glukosemetabolisme, noe som er velkjente effekter av trening *in vivo*. I tillegg hadde EPS-stimulering effekt på genekspressjonen i myotubene [49].

1.7 Skjelettmuskel som et endokrint organ

Skjelettmuskulatur er et fleksibelt organ som er involvert i ulike prosesser. Nylig er skjelettmuskel identifisert som et endokrint organ som produserer og frigjør cytokiner, kalt myokiner [50]. Funksjonen til slike myokiner kan gi et innblikk i hvordan skjelettmuskel kommuniserer med andre organer. Myokiner kan utøve sin effekt ved autokrin, parakrin eller endokrin sekresjon. Det er identifisert flere myokiner, deriblant IL-6, IL-7, IL-8, IL-15 og myostatin. IL-6 ble identifisert som det første myokinet utskilt i blod som respons på muskelkontraksjon. De fleste studier av myokiner har til nå vært i forbindelse med den biologiske rollen til IL-6 [48].

1.7.1 Interleukin-6 (IL-6)

Nivåene av IL-6 øker betydelig under trening. Det var lenge en hypotese at treningsindusert økning av IL-6 var en immunrespons på lokal skade i muskulaturen, hvor makrofager var ansvarlig. Denne hypotesen ble forkastet da monocytter ikke viste økt mRNA-nivå av IL-6 som et resultat av trening [48, 50]. IL-6 blir oftest klassifisert som et proinflammatorisk cytokin da IL-6 som produseres av makrofager fører til en inflammatorisk respons. Ved produksjon og sekresjon av IL-6 fra skjelettmuskel aktiveres ikke de proinflammatoriske signalveiene og det kan virke som funksjonen til IL-6 er avhengig av hvilket miljø IL-6 stammer fra (muskelceller *versus* immunceller) [51].

IL-6 som frigjøres fra skjelettmuskel er sett å kunne bedre insulinsensitiviteten, mens IL-6 sekret fra fettvev kan indusere insulinresistens i skjelettmuskel. IL-6 har flere metabolske funksjoner og kan fungere som en energisensor i muskelcellene [50]. Carey *et al.* viste at akutt behandling med IL-6 økte insulinstimulert glukoseopptak *in vivo*. Samtidig ble det demonstrert at IL-6 økte fettsyreoksidasjon, glukosetransport og GLUT4-translokasjon *in vitro*. Effekten på glukose- og fettsyremetabolismen *in vitro* syntes å være mediert gjennom aktivering av AMPK [47]. IL-6 har også eksokrine effekter som omfatter økt hepatisk glukoseproduksjon ved trening og økt lipolyse fra fettvev [50].

1.8 Energimetabolismen i skjelettmuskel

1.8.1 Glukosemetabolismen

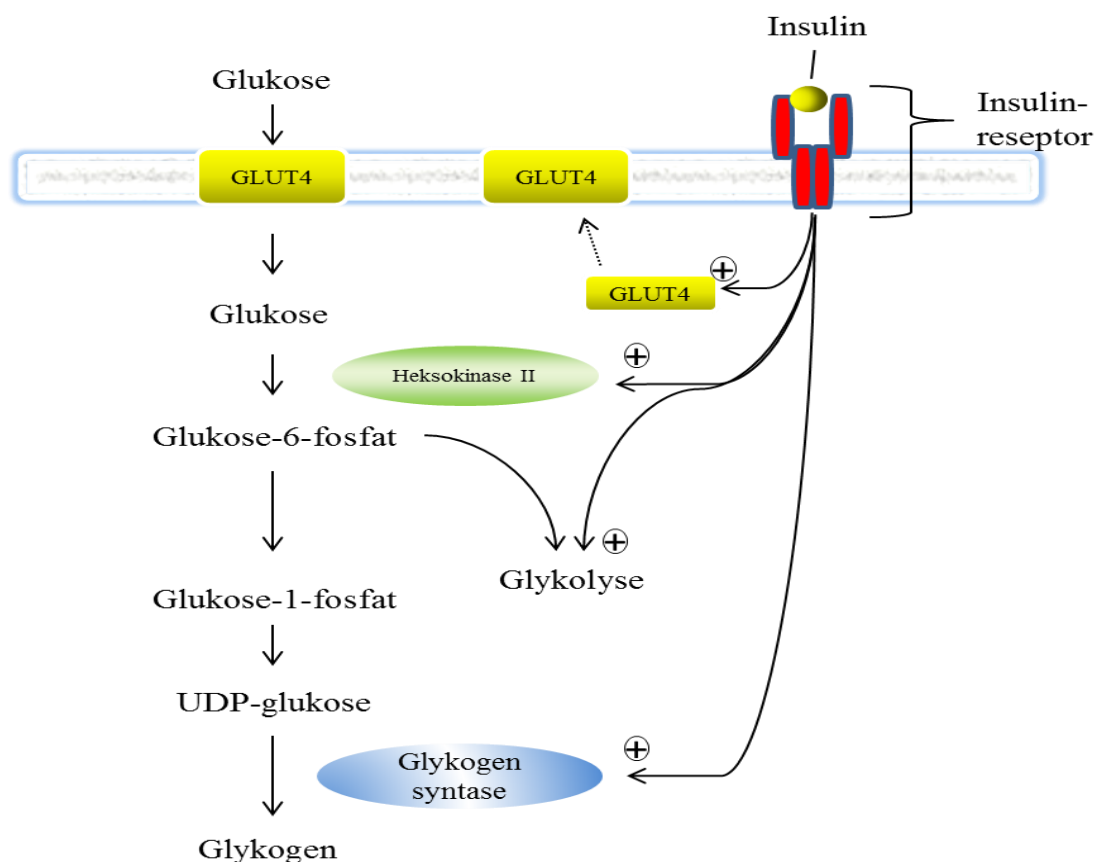
Skjelettmuskulatur er et metabolsk aktivt vev som spiller en viktig rolle i omsetningen av en rekke næringsstoffer. Glukose er et viktig energisubstrat for human skjelettmuskel og skjelettmuskel står for rundt 80-85 % av kroppens glukoseopptak [52]. Glukose kan lagres i form av glykogen, fungere som en forløper for syntese av fettsyrer og oksideres for å danne ATP. Det hastighetsbestemmende trinnet i glukosemetabolismen er opptaket og transporten over plasmamembranen [53]. Glukose tas opp i skjelettmuskel ved hjelp av spesifikke transportproteiner kalt glukosetransportører (GLUT) [53-55]. Det er blitt identifisert 15 forskjellige isoformer av GLUT-proteiner, hvorav minst fem er uttrykt i human skjelettmuskel [56]. Under basale forhold er GLUT1 ansvarlig for opptaket av glukose [57], mens ved kontraksjons- og insulin-stimulerte forhold er GLUT4 dominerende [43]. Uttrykket av GLUT4 i skjelettmuskel er rundt 20 ganger så høyt som for GLUT1. GLUT1 er lokalisert i cellemembranen, mens GLUT4 er lokalisert i intracellulære vesikler [56]. Ved kontraksjon- og insulin-stimulerte forhold øker translokasjonen av GLUT4 til cellemembranen og bidrar til økt glukoseopptak [54].

Etter å ha blitt transportert over cellemembranen blir glukose umiddelbart fosforylert av enzymet heksokinase til glukose-6-fosfat (G6P) [58]. Videre blir G6P enten inkorporert og lagret som glykogen, eller går inn i glykolysen for oksidasjon og produksjon av ATP. I glykolysen blir rundt 90 % av glukosen oksidert, mens 10 % blir frigjort som laktat [31]. Et glukosemolekyl blir omdannet til to pyruvatmolekyler, noe som omfatter en sekvens på 10 separate reaksjoner. Nettogevinst av disse reaksjonene er dannelsen av energi i form av to ATP-molekyler. Videre omdannes pyruvat til acetyl-CoA og tar del i sitronsyresyklus og oksidativ fosforylering [59]. Det hastighetsbestemmende trinnet i glukoseoksidasjonen er omdannelsen av pyruvat til acetyl-CoA. Denne reaksjonen katalyseres av pyruvat dehydrogenase komplekset (PDC). PDC kan fosforyleres og inaktiveres av pyruvat dehydrogenase kinase (PDK). Dette fører til redusert oksidasjon av glukose og kan gi et skifte i energisubstrat over til oksidasjon av fettsyrer. I human skjelettmuskel uttrykkes det to isoformer av PDK, hvor PDK4 er den dominerende isoformen [60, 61].

Glykogen og glykogensyntese

Karbohydrater i kroppen lagres som glykogen. De største glykogenlagrene finnes i lever og skjelettmuskel, hvor skjelettmuskel står for rundt 80 % av glykogenlagringen [26] og er hovedkilden til energi under trening [62]. Glykogenlagrene kan variere stort ut i fra treningsmengder og diett. I utrente individer ligger mengden glykogen i muskel mellom 80 - 100 $\mu\text{mol/g}$, mens for de som trener daglig og har en normal diett kan glykogenlagrene ligge mellom 130 - 135 $\mu\text{mol/g}$ [63].

I glykogensyntesen omdannes G6P til glukose-1-fosfat (G1P). G1P og uridintrifosfat danner så uridindifosfat-glukose (UDP-glukose). Det hastighetsbestemmende trinnet i syntesen av glykogen er transporten av UDP-glukose til den ikke-reduserende enden av glykogenmolekylet. Her hektes glukose på glykogenmolekylet i α -1-4-binding. Enzymet glykogensyntase katalyserer det siste trinnet og er det viktigste enzymet som reguleres av insulin i glykogensyntesen [52, 63]. En forenklet figur over glukosemetabolismen i skjelettmuskel er presentert i figur 1.3.



Figur1.3: Forenklet oversikt over glukosemetabolismen i skjelettmuskel. Glukose tas opp i cellene ved hjelp av GLUT4. Glukose omdannes av heksokinase II til glukose-6-fosfat, går videre til glykolyse eller omdannes til glukose-1-fosfat og videre til UDP-glukose. Insulin aktiverer glykogensyntase. Glykogensyntase katalyserer det siste trinnet i syntesen hvor glukose hektes på glykogenmolekylet. Modifisert fra [64].

Treningsindusert glukoseopptak

Som beskrevet i avsnitt 1.4.1 fører insulin til translokasjon av GLUT4 ved en rekke intracellulære reaksjoner. Treningsindusert GLUT4-translokasjon er uavhengig av insulin-signalveien. Under trening kan glukoseopptaket i skjelettmuskel øke betraktelig. Hvilke mekanismer som fører til GLUT4-translokasjon ved muskelkontraksjon er ikke fullstendig klarlagt, men det er flere potensielle mekanismer. Mulige signalveier inkluderer faktorer som kalsium, nitrogenoksid, frie radikaler og AMPK [65].

1.8.2 Fettsyremetabolismen

Fettsyrer er i tillegg til glukose en viktig kilde til energi i skjelettmuskel. På bakgrunn av sin størrelse og metabolske profil er skjelettmuskel vesentlig for fettsyreoksidasjon (FSO). FSO er den viktigste kilden til energi ved hvile. Dagenais *et al.* så på FSO ved hvile, de fant at 80 % av oksygenforbruket var i forbindelse med oksidasjon av lipider. De fant i tillegg at frie fettsyrer (FFA) som ble tatt opp av muskel i hvile ikke ble oksidert direkte, men muligens ble lagret intramuskulært, som en kilde til energi [66].

Det er to hovedkilder til FFA i blodet. Den ene kilden er FFA som er bundet til albumin og som opprinnelig stammer fra lipolyse i fettvev. Den andre kilden er FFA som er hydrolysert fra triglyserider som har vært lagret i kylomikroner eller very low-density lipoproteiner (VLDL) [67]. Lipoprotein lipase spiller en viktig rolle i hydrolysen av triglyserider [68].

FFA blir tatt opp i cellene gjennom passiv diffusjon, med bakgrunn i sin lipofile struktur, eller via protein-mediert transport [67, 69]. Det er blitt identifisert en rekke fettsyretransportører som FAT/CD36, FABP og FATP (fettsyretranslokase, fettsyrebindende protein, fettsyre transportprotein). FAT/CD36 er den mest dominerende og best studerte transportøren som transporterer FFA inn i cytosol [67]. FFA kan videre ut fra behov bli lagret som triglyserider, fosfolipider eller bli oksidert i mitokondriene for energiproduksjon. I cytosol blir FFA transportert intracellulært av FABP før de blir omdannet til acyl-CoA [70]. Før acyl-CoA kan transporteres inn i mitokondriene blir acyl-CoA omdannet til acylkarnitin av enzymet karnitin palmitoyltransferase 1 (CPT1). CPT1 er lokalisert på ytre membranen av mitokondriene og er en del av det karnitin-avhengige transportkomplekset. CPT1 er det hastighetsbestemmende enzymet som er involvert i opptak og oksidasjon av fettsyrer i

mitokondriene. Inne i mitokondriene blir acylkarnitin omdannet tilbake til acyl-CoA av CPT2. Videre blir acyl-CoA oksidert (β -oksidasjon) til acetyl-CoA som deretter kan oksideres videre i sitronsyresyklusen [67].

1.8.3 Metabolsk fleksibilitet i skjelettmuskel

Skjelettmuskulatur regnes som et metabolsk fleksibelt organ. Etter måltid dominerer glukoseoksidasjonen, mens lipidoksidasjonen blir viktigere under faste og vedvarende trening [71]. Metabolsk fleksibilitet karakteriseres som skjelettmusklenes evne til å kunne bytte energisubstrat fra lipidoksidasjon under faste til økt glukoseoksidasjon i respons på insulin. Samtidig vil glukoseoksidasjon under faste, og lipidoksidasjon under insulin-stimulerte forhold, undertrykkes. En slik fleksibilitet er typisk for frisk human skjelettmuskel [72, 73]. Kelley og Mandarino definerte et tap av denne funksjonen som metabolsk infleksibilitet [74]. Fedme, insulinresistens og T2D er tilstander assosiert med metabolsk infleksibilitet hvor bytte fra lipidoksidasjon til glukoseoksidasjon postprandialt er svekket [71].

1.9 Mål for oppgaven

Fysisk aktivitet gir en god helsegevinst i forbindelse med tilstander som fedme, metabolsk syndrom og T2D. Effekt av trening er vist å være forebyggende, men kan også benyttes i behandlingen av metabolske sykdommer. Tidligere studier utført av Bourlier *et al.* har vist at treningsinduserte endringer på glukosemetabolismen *in vivo* kan bevares i cellekulturer *in vitro* [75]. Jenny Lund har i sin masteroppgave [76] vist at effekten av trening på oljesyremetabolismen er bevart i humane myotuber *in vitro*. Målet med denne oppgaven er å se om effekt av trening *in vivo* og trening *in vitro* i form av EPS-stimulering påvirker dyrkede humane myotuber *in vitro*. Følgende delmål for oppgaven er satt:

- Undersøke om effekt av trening på insulinfølsomheten *in vivo* er bevart i humane myotuber *in vitro*.
- Undersøke om trening *in vivo* har effekt på proteinuttrykk av en markør for type-1 muskelfibre.
- Undersøke om trening *in vivo* gir en endring i responsivitet på trening *in vitro* i forhold til uttrykk av gener involvert i fettsyre- og glukosemetabolismen, samt genuttrykk for type-1 muskelfibre.
- Undersøke om kondisjonert medium fra celler før og etter trening *in vivo*, og før og etter trening *in vitro* i form av EPS, har effekt på glukose- og fettsyremetabolismen i humane myotuber *in vitro*.

2 Materialer og metode

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 2.1: Oversikt over kjemikalier og reagenser benyttet i denne oppgaven

Leverandør	Kjemikalier og reagenser
Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Danmark)	Actrapid® Penfill® 100 IE/ml
Agilent Technologies Inc (Cedar Creek, TX, USA)	Nuclease-free H ₂ O, 25 ml
Applied Biosystems™ (Warrington, Storbritannia)	Power SYBR® Green PCR Master Mix, 5ml
Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA, USA)	Bio-Rad Protein Assay Dye reagent Concentrate
Cell Signaling Technology® Inc. (Danvers, MA, USA)	Phospho-Akt (Ser473) Antibody
	Anti-mouse IgG, HRP linked Antibody
	Anti-rabbit IgG, HRP linked Antibody
	Akt Antibody
	Precision Plus Standard Dual Color
	Precision Plus Standard Blue
Gibco® Invitrogen, Gibco Life Technologies (Paisley, Skottland, Storbritannia)	α – Tubulin Antibody
	Dulbecco's Phosphate Buffered Salin (DPBS utan Ca ²⁺ og Mg ²⁺)
	Fungizone® (250 µg/ml amphotericin B)
Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	Føtalt kalveserum
Merck Millipore (Billerica, MA, USA)	Primere (36B4, PDK4, MYH7, IL-6, CPT1b)
Pall Life Sciences (Cergy-Saint. Christophe, Farnkrike)	Anti-Myosin slow muscle
PerkinElmer® (Boston, MA, USA)	Ultroser™G
Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, USA)	D-[14C(U)]glucose 100 µCi/ml
	[1-14C]oleic acid 100 µCi/ml
	OptiPhase supermix
Sigma-Aldrich™ (Shelton, Scotland, USA)	p-IRS1 (Tyr632) Antibody
Sigma-Aldrich™ (Shelton, Scotland, USA)	HEPES
	L-Karnitin hydroklorid

Sigma-Aldrich™ (St. Louis, MO, USA)	Bovint serumalbumin (BSA)
	Bovint glykogen fra lever
	Bromfenolblått
	Dimetylsulfoksid (DMSO)
	Glukose
	B-merkaptoetanol
	Protease Inhibitor Cocktail
Thermo Scientific™, Life Technologies (Paisley, Skottland, Storbritannia)	Tryptanblått 0,4 % løsning
	Pierce® BCA Protein Assay Kit

2.1.2 Utstyr

2.2: Oversikt over det utstyret som er benyttet i denne oppgaven.

Leverandør	Utstyr
AB Applied Biosystems (Stockholm, Sverige)	AbiPrism 7000 Sequence Detection System
	2720 Thermal Cycler
Agilent Technologies Inc (Cedar Creek, TX, USA)	Agilent Total RNA Isolation Mini Kit
Applied Biosystems™ (Foster City, CA, USA)	StepOnePlus™ Real-Time PCR System
	MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate
	MicroAmp® Optical Adhesive Film, PCR Compatible, DNA/RNA/RNase Free
Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)	ChemiDoc™ XRS+ System with Image Lab™ Software
Corning Inc (Corning, NY, USA)	15 ml Centrifuge Tube, Centristar™ Cap
	50 ml Centrifuge Tube, Centristar™ Cap
	Corning® Cellbind® Surface 25 cm ² flasker
	Corning® Cellbind® Surface 96-brønners Brett med lokk
GE Healthcare (Little Chalfont, UK)	Amersham™ Protran™ 0,45 µm nitrocellulose blotting membrane
Gibco®, Invitrogen™ (Gibco, Life Technologies, Eugene, OR, USA)	Countess™ automated cell counter
	Countess™ counting chamber slides
Instrumentverkstedet (Teknisk avdeling, Universitet i Oslo, Norge)	Trappestativ, med metallskruer, metallplate og silikonplate inkludert

Packard (USA)	Tri-Carb Liquid Scintillation analyzer 1900 TR
PerkinElmer™ (Waltham, MA, USA)	Isoplate™-96
	Microbeta ² Plate Counter
	Pico Pias Vial, 6 ml, Anti-Static
	Wallac Victor™ X4
Thermo Scientific (Roskilde, Danmark)	Heraeus Fresco 21 Centrifuge
	Nanodrop Lite Spectrophotometer
	NUNC celleflasker, 25 cm ²
TPP®/MIDSCI® (St. Louis, MO, USA)	Cell scrapers 24 cm

2.2 Donorkarakteristika

Arbeidet som er blitt gjort i denne oppgaven er basert på humane skjelettmuskelceller i kultur. Det er benyttet ulike donorgrupper, hvor del 1 beskriver donorene som var del av en treningsstudie og som ble benyttet i størst grad i denne oppgaven. For de resterende donorene se del 2 av donorkarakteristika.

2.2.1 Donorkarakteristika del 1

Det ble tatt biopsier fra *musculus vastus lateralis* av åtte frivillige donorer, etter skriftlig, informert samtykke, før og etter en 12 ukers treningsintervensjon. Alle donorene var menn i alderen 40-62 år, fysisk inaktive og hverken røykte eller stod på noen faste legemidler. Inaktiv ble definert som å trene mindre enn én time i uka. Deltakerne bestod både av normalvektige og overvektige. Det ble totalt gjennomført 4 treningsøkter i uken, hvorav to økter med styrketrening og to økter med utholdenhetstrening. Alle fikk oppfølging av instruktør fra Norges Idrettshøyskole. Studien var godkjent av Regional Etisk Komité (referansenummer 2011/882), og har identifikasjonskode NCT01803569 i databasen ClinicalTrials.gov.

2.2.2 Styrketrening

Styrketreningen bestod av åtte øvelser. Hver økt ble innledet med 10 minutters aerob oppvarming som varierte mellom løping på tredemølle, sykling på spinningssykkel eller roing på romaskin. Styrkeøvelsene inkluderte benkpress, beinpress, skulderpress, ryggøvelse, nedtrekk og sittende-roing. I de tre første ukene ble det gjennomført 3 sett à 12 repetisjoner.

Etter fire uker økte belastningen slik at det ble gjennomført 3 sett à 10 repetisjoner. I åttende uke ble igjen treningsbyrden økt, slik at det ble gjennomført 3 sett à 8 repetisjoner.

Maksimal styrke før og etter treningsintervensjonen ble målt ved test i tre ulike styrkeøvelser. Her ble styrkeøvelsene brystpress, nedtrekk og beinpress valgt ut. Før testen skulle deltakerne varme opp i 10 minutter med løping eller sykling. Testen startet med en vektbelastning på 50 % av forventet maksimal styrke. Deretter ble vektbelastningen gradvis økt inntil maksimal styrke ble nådd. Hver deltaker fikk to forsøk på maksimal styrke.

2.2.3 Utholdenhetstrening

Utholdenhetstreningen bestod av intervaller på sykkel. Treningen startet med oppvarming i 12-15 minutter hvor tre intervaller på 4-5 minutter ble gjennomført. Disse intervalldragene skulle kjøres på 60 %, 70 % og 75 % av maksimal hjerterefrekvens (HF_{\max}). Deretter fulgte hoveddelen som varte i 60 minutter. Den ene av øktene bestod av intervaller på 2 minutter ved $HF_{\max} > 90$ %. I mellom hvert drag var det 2 minutters restitusjon med lav intensitet ($HF_{\max} = 60$ %). Det ble lagt inn en lengre restitusjonsperiode på 5 minutter i midten av økten ($HF_{\max} = 60$ %). Den andre økten bestod av 7 minutters intervaller ved omtrent 85 % av HF_{\max} . Mellom hvert intervalldrag var det 3 minutters restitusjon ved omtrent 60 % av HF_{\max} . Avslutningsvis for begge øktene var det nedtrapping i 5 minutter med rolig sykling på selvvalgt intensitet.

Som et mål på deltakernes aerobe kapasitet ble $VO_{2\max}$ brukt. Deltakerne måtte igjennom en standardisert test før og etter treningsintervensjonen. Oppvarminga bestod av 3-4 intervaller på 5 minutter, hvor intensiteten økte hvert femte minutt. Videre syklet deltakerne i 5 minutter på lavere intensitet. Selve testen bestod av 45 minutters sykling med en intensitet tilsvarende 70 % av estimert $VO_{2\max}$.

2.2.4 Effekt av treningsintervensjonen

Effekten deltakerne hadde av den 12 ukers lange treningsintervensjonen er vist i tabell 2.3.

Ut i fra tabellen ser vi at deltakerne i gjennomsnitt viste en signifikant forbedring i styrke, utholdenhet og insulinsensitivitet etter treningsintervensjonen. Vi ser også at vektnedgang i form av nedgang i KMI og kroppsvekt er signifikant. Donorene fra treningsstudien hadde donorkode 1, 2, 13, 17, 21, 53, 71 og 86.

Tabell 2.3 Effekter av treningsintervensjonen. KMI, kroppsmasseindeks; GIR, «clamp» glukoseinfusjonshastighet; VO_{2max} , maksimalt oksygenopptak. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM for åtte deltakere ($n = 8$). * $p < 0,05$ vs. før trening (paret ikke-parametrisk test).

	Før trening	Etter trening
Kroppsvekt, kg	92,0 \pm 5,7	87,5 \pm 5,2*
KMI, kg/m²	27,5 \pm 1,5	26,1 \pm 1,2*
GIR, mg/kg/min	4,9 \pm 0,9	7,4 \pm 1,1*
VO_{2max} ml/kg/min	38,6 \pm 2,1	45,0 \pm 2,5*
Brystpress_{max}, kg	69,1 \pm 7,1	82,5 \pm 7,4*
Nedtrekk_{max}, kg	76,3 \pm 6,7	89,1 \pm 5,2*
Beinpress_{max}, kg	216,0 \pm 19,5	249,4 \pm 20,4*

2.2.5 Donorkarakteristika del 2

I tillegg til donorene benyttet fra treningsstudien beskrevet ovenfor, ble det brukt humane skjelettmuskelceller fra to andre donorer. Disse ble benyttet i substratoksidasjonsforsøkene hvor vi så på kondisjonerte medier fra donorer i del 1. I dette tilfellet var donorvariasjoner av mindre interesse. Donorene var navngitt LD-donorer (lean donor) og AR-donor (atlet-donor) (tabell 2.4). Fra AR-donoren ble det tatt biopsi fra *musculus vastus lateralis*, mens for LD-donorene ble det tatt biopsi fra *musculus obliquus internus abdominis*.

Tabell 2.4: Kliniske data for LD- og AR-donorer. KMI, kroppsmasseindeks.

Donorgruppe	Kjønn (M/K)	Alder (år)	KMI (kg/m ²)
LD 17	K	56	23,2
AR 11	M	27	23,4

2.3 Celledyrking

2.3.1 Opprettelse av cellebank

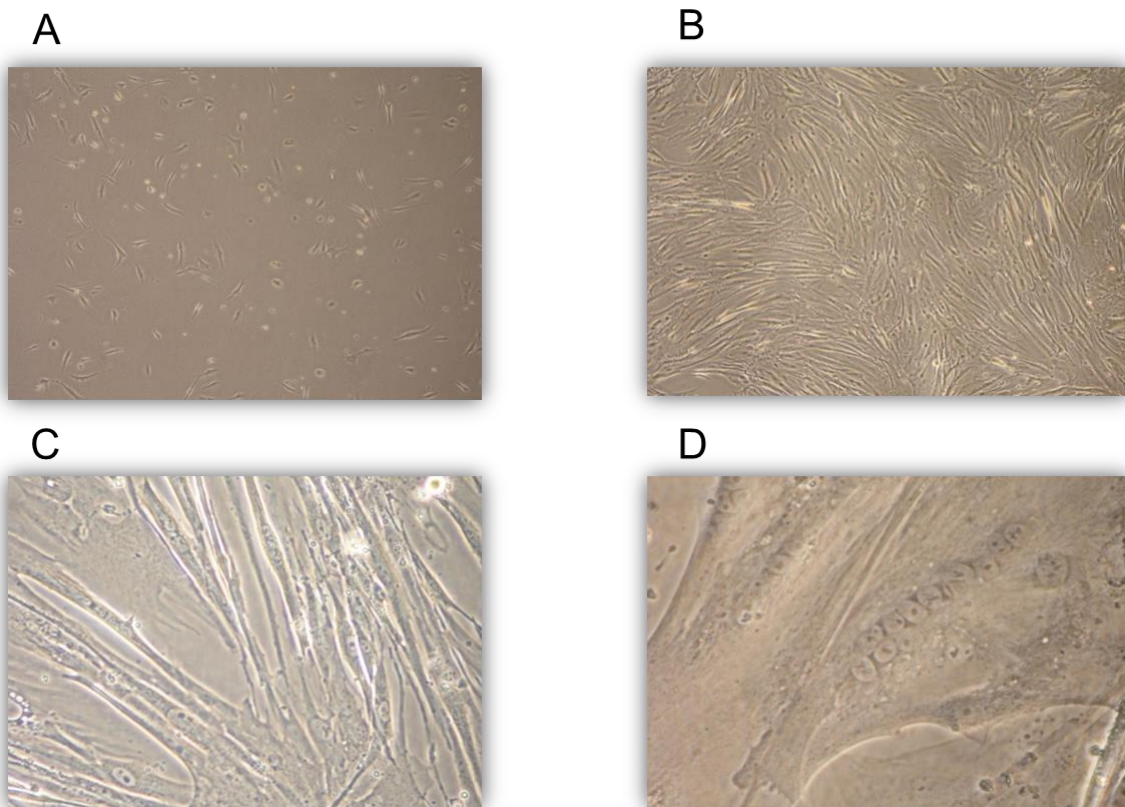
Fra muskelbiopsiene ble det opprettet en cellebank. Satellittceller ble isolert og oppskalert i flere passasjer. De oppskalerte cellene (myoblaster) ble oppbevart i en nitrogentank.

2.3.2 Utsåing

Utsåingsmediet (se appendiks 1.1) ble overført til et 50 ml rør og forvarmet på vannbad ved 37 °C. Celleampuller ble tatt opp fra nitrogentanken, og tint raskt ved 37 °C på vannbad. Innholdet ble overført til et 50 ml rør, hvor det så ble tilsatt utsåingsmedium til totalt 5 ml. Røret ble sentrifugert på 1300 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og cellepelletten ble resuspendert i 1 ml medium. 20 µl av cellesuspensjon ble overført til et eppendorfrør, og tilsatt 20 µl trypanblått 0,4 % løsning. Antall celler ble talt ved hjelp av celledelleren, for å beregne volumet av cellesuspensjonen som skulle brukes til utsåingen. Beregnet volum ble overført til et nytt 50 ml rør, og tilsatt medium til ønsket volum. Dette ble så overført til enten 25 cm²-flasker, 6-brønners eller 96-brønners brett. Cellene ble satt i ett inkubatorskap som holdt 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer.

2.3.3 Proliferasjon og differensiering

Etter 24 timer ble medium på cellene byttet fra utsåingsmedium til proliferasjonsmedium (se appendiks 1.2). Proliferasjonsmediet ble videre byttet hver 2.-3.dag til cellene var blitt 80-90 % konfluente. Deretter ble det tilsatt differensieringsmedium (se appendiks 1.3) som inneholdt insulin og mindre serum. Dette gjorde at muskelcellene differensierte til myotuber. Cellene ble lange og fikk flere cellekjerner. I tillegg fikk de et karakteristisk utseende og mønster. Differensieringsmediet ble byttet hver 2-3. dag før cellene ble høstet etter rundt 7 dager. Figur 2.1 viser utviklingen av muskelcellene under celledyrkningsprosessen.



Figur 2.1: Bilder av humane skjelettmuskelceller fra celledyrkningsprosessen: Celler isolert fra donor 17 etter treningsintervensjonen. A) Muskelceller etter 24 timer i utsåingsmedium. Bildet er tatt med 4x forstørrelse. B) Bilde av muskelcellene etter 7 dager i proliferasjonsmedium før bytte til differensieringsmedium, hvor cellene er blitt 80-90 % konfluente. Bildet er tatt med 4x forstørrelse. C) Bilde av muskelcellene etter 7 dager i proliferasjonsmedium. Bildet er tatt med 20x forstørrelse. D) Bildet av muskelcellene etter 3 dager i differensieringsmedium. Bildet er tatt med 40x forstørrelse, hvor det er mulig å se at cellene har differensiert og blitt til flerkjernede myotuber.

2.4 Elektrisk pulsstimulering (EPS) av myotuber

Cellene ble dyrket opp som beskrevet i avsnitt 2.3. Etter 5 dager i differensieringsmediet ble cellene stimulert med elektriske impulser i 48 timer. Dette ble gjort ved bruk av en elektrisk muskelstimulator og karbonelektroder. Muskelstimulatoren som ble brukt er laget ved Elektronikklaboratoriet, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo. Karbonelektroder ble festet til et lokk som var tilpasset et 6-brønnersbrett, og plassert i brønnene. Myotubene ble utsatt for kronisk, lavfrekvent stimulering med enkeltpulser på 2 ms, 30 V og frekvens på 1 Hz de siste 48 timene av differensieringsperioden. Det ble skiftet differensieringsmedium hver 24. time under stimuleringen.

2.5 Glykogensyntese

2.5.1 Høsting av celler til glykogensyntese

Cellene ble dyrket opp i 6-brønners brett som beskrevet i avsnitt 2.3. Etter 7 dager i differensieringsmediet ble cellene behandlet med eller uten insulin før cellene ble høstet. Cellebrettet ble delt i to, hvor tre av brønnene ble tilsatt 1 ml prøvemedium med 100 nmol/l insulin, mens de resterende tre brønnene ble tilsatt 1 ml prøvemedium uten insulin. Cellebrettet ble så satt i inkubatorskap som holdt 37 °C og 5 % CO₂ i 3 timer. Prøvemediet bestod av DMEM (uten glukose), 0,5 µCi/ml D-[¹⁴C(U)]glukose og 0,5 mmol/l kald glukose. Etter 3 timer ble mediet sugd av og hver brønn ble vasket to ganger med 1 ml iskald PBS. Det ble tilsatt 400 µl av 1 mol/l KOH i hver brønn, før prøvene ble fryst ved -20 °C.

2.5.2 Glykogensyntese

Prøvene ble tatt opp fra fryseren og tint før 200 µl av cellelysatsatet ble overført til 2 ml eppendorfrør. Videre ble det tilsatt 65 µl av en 60 % KOH-løsning og 35 µl av en 120 mg/ml glykogenløsning. Eppendorfrørene ble inkubert på varmeblokk ved 80 °C i 20 minutter. Deretter ble rørene avkjølt på is før de ble tilsatt 1 ml iskald 100 % etanol og blandet slik at glykogen ble utfelt. Rørene ble sentrifugert ved 4 °C, 10 000 rpm i 20 minutter. Det ble dannet en pellet av glykogen i bunnen av rørene. Denne ble vasket med 1 ml kald 70 % etanol og mikset med vortex. Rørene ble igjen sentrifugert ved 4 °C, 10 000 rpm i 20 minutter. Supernatanten ble fjernet og rørene lufttørket. Pelleten ble resuspendert i 0,5 ml destillert H₂O og mikset med vortex før de ble satt på The Belly Dancer[®] i 20 minutter. Væsken ble overført til tellerør og tilsatt 3 ml OptiPhase Supermix[®] tellervæske. Rørene ble satt i scintillasjonstelleren, Tri-Carb 1900 TR[®] Liquid Scintillation Analyzer og talt. D-[¹⁴C(U)]glukose er en β-emitterende nuklide som ble brukt for å detektere mengde glykogen syntetisert. Scintillasjonstelleren detekterte den ioniserende strålingen og målte desintegrasjonen per minutt for hvert rør.

2.5.3 Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit for proteinmåling

Telletallene fra scintillasjonstelleren ble korrigert i forhold til mengde protein i hver brønn. Proteinmengden ble målt ved bruk av Pierce[®] BCA Protein Assay Kit [77]. Denne metoden benytter seg av et velkjent prinsipp der Cu²⁺ reduseres til Cu⁺ i nærvær av aminosyrene tryptofan, cystein, cystin og tyrosin. Hvert Cu⁺-ion danner et kompleks med to BCA-molekyler og gir et lilla-farget produkt som absorberer lys ved 562 nm. Dette utnyttes ved

kolorimetri og absorbansen kan detekteres ved hjelp av et spektrofotometer. De ukjente proteinkonsentrasjonene kan beregnes ved kjent standardkurve.

Ved proteinmålingen ble microplate 96-brønners brett benyttet. BSA-standarder ble brukt til å lage standardkurve; her var konsentrasjonene 0, 0,06, 0,125, 0,25, 0,5 og 1 mg/ml. 10 µl prøve ble tilsatt hver brønn, med en parallell av hver prøve. BCA-reagens A og BCA-reagens B ble blandet i forholdet 50:1. 200 µl av løsningen ble tilsatt hver brønn før brettet ble satt i ett inkubatorskap som holdt 37 °C i 30 minutter. Absorbansen ble målt ved 562 nm på VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader.

2.6 Westernblotting

Westernblotting er en semi-kvantitativ metode som separerer og identifiserer proteiner. Proteinene separeres fra hverandre basert på deres molekyllstørrelse ved hjelp av gelelektroforese. Deretter blir resultatene blottet over på en membran. Proteinene kan så påvises ved bruk av spesifikke antistoffer.

2.6.1 Utsåing til western

Cellene ble dyrket opp i NUNC 25 cm²-flasker som beskrevet i 2.3. Det ble sådd ut 150 000 celler per flaske, og totalt to flasker per donor.

2.6.2 Høsting

Etter at cellene hadde differensiert til myotuber (7 dager i differensieringsmedium) ble cellene høstet. Til den ene flasken ble det tilsatt 100 nmol/l insulin, før den ble satt i inkubatorskap som holdt 37 °C, 5,0 % CO₂ i 15 minutter. Flasken ble så tatt ut og satt på is for å stoppe insulinsignaleren. Den andre flasken ble ikke forbehandlet. Selve høstingen var lik for begge flaskene; først ble de vasket to ganger med 2 ml kald PBS, før 100 µl høstebuffer ble tilsatt til hver flaske. Alle restene av PBS ble sugd av etter siste vask. Flaskene ble skrapet av nøye, og innholdet ble overført til et eppendorfrør. Høstebufferen (se appendiks 2.1) som ble brukt inneholdt 2x-samplebuffer, proteasehemmer og fosfatasehemmercocktail 2. 2x-samplebuffer (se appendiks 2.2) bestod blant annet av SDS (sodium dodecyl sulfate) som er en anionisk detergent som denaturerte proteinene. I tillegg ga SDS en sterk negativ ladning til de denaturerte proteinene. Protease- og fosfatasehemmere

hindret henholdsvis proteolyse og en defosforylering av proteinene. Eppendorfrørerne ble så satt på varmeblokk på 100 °C i 5 minutter. Deretter ble 15 µl tatt ut i et eppendorfrør for proteinmåling. Til det resterende volumet ble det tilsatt 10 % β-merkaptoetanol og 5 % bromfenylblått. β-merkaptoetanol ble brukt for å bryte disulfidbroene i proteinene, mens bromfenylblått farget prøvene blå. Prøvene ble satt på varmeblokk på 100 °C i 5 minutter før de ble fryst ved -20 °C.

2.6.3 Gelelektroforese

I elektroforesen ble det brukt Mini-PROTEAN® TGX™ Gels med 4-20 % akrylamid. Det vil si at mengden av akrylamid økte etter hvert som proteinene vandret nedover gelen. Gelen ble pakket ut og plaststrimmelen på undersiden ble fjernet slik at strømmen kunne sendes gjennom gelen. Kammen ble så forsiktig dratt ut før gelen ble satt i en Mini-PROTEAN® elektroforeseboks. Elektroforesebuffer (se appendiks 2.3) ble tilsatt i elektroforeseboksen opp til angitt nivå, og mellom gelene slik at brønnene ble fylt. Proteinkonsentrasjonen ble målt ved hjelp av NanoDrop™ Lite spektrofotometer, slik at alle brønnene fikk samme proteinmengde. Markøren som ble brukt het Precision Plus Protein™ Standards Dual Color. Det ble tilsatt 5 µl av standarden i brønn nummer en. Til de resterende brønnene ble det tilsatt et volum tilsvarende 25 µg protein av de forskjellige prøvene. Strømmen ble så koblet til elektroforeseboksen, hvor elektroforesen ble kjørt på 200 V i cirka 1 time. Proteinene vandret fra negativ til positiv elektrode, og ble separert etter molekylstørrelse.

2.6.4 Blotting

Etter elektroforesen ble proteinene overført til en nitrocellulose blottingmembran med porestørrelse 0,45 µm. Metoden som ble brukt kalles semi-dry blotting. Det ble laget en sandwich bestående av 3x filterpapir, membran, gel og 3x filterpapir. Alt var blitt fuktet i blottebuffer (se appendiks 2.4) i 30 minutter før blottingen fant sted. Det var viktig at membranen lå mellom gelen og den positive elektroden slik at proteinene migrerte over til membranen. Eventuelle luftbobler ble fjernet før blotting. Blottingen ble kjørt ved 32 mA per gel i 1 time på TE70 ECL Semi-Dry Transfer Unit, blottemaskin. Etter endt blotting ble standarden på membranen markert med kulepenn og membranen ble overført til et 50 ml sentrifugerør.

2.6.5 Blokking og påsetting av antistoff

Membranen ble blokket i en løsning bestående av 5 % tørrmelk og T-TBS (se appendiks 2.5) i overkant av 1 time. Dette var et viktig trinn for å hindre uspesifikk binding av antistoffer til membranen. Membranen ble tilsatt primært antistoff og inkubert i kjølerom over natt på Orbital Rotator, 50 sykluser/minutt. De primære antistoffene som ble brukt var henholdsvis anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³) og anti-total-Akt. Neste dag ble membranen vasket i 3 x 15 minutter med T-TBS for å fjerne eventuelle løse rester av antistoffet. Deretter ble membranen inkubert med sekundært antistoff i 60 minutter i romtemperatur. Det sekundære antistoffet var anti-kanin IgG. Membranen ble så vasket i 3 x 15 minutter med T-TBS i romtemperatur.

2.6.6 Fremkalling

For fremkalling ble BioRad® Clarity™ Western ECL Substrate benyttet. Det bestod av to reagenser, Peroxid Solution og Luminol/enhancer solution. Disse ble blandet i forholdet 1:1. Membranen ble inkubert med denne løsningen i 5 minutter. Deretter ble membran plassert i en ChemiDoc™ XRS+ hvor blottene ble kvantitert ved detektering av kjemiluminescens. Kjemiluminescens skyldtes kjemiske prosesser, hvor et enzym, her pepperrot peroksidase, katalyserte kløyvingen av konjugatet på det sekundære antistoffet. Luminescens ble dannet som et biprodukt til denne reaksjonen. Mengden luminescens ble detektert og relatert til mengde protein.

2.7 Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR)

Kvantitativ real-time polymerase-kjedereaksjon (qPCR) er en metode som kan benyttes til å undersøke endringer i mRNA-uttrykk i celler. I denne oppgaven ble qPCR benyttet til å se på endringer i genuttrykket før og etter trening *in vitro* i form av elektrisk pulsstimulering (EPS). De ulike genene som ble undersøkt spiller en viktig rolle i reguleringen av energimetabolismen i kroppen. For løsninger og reaksjonsblandinger brukt i forbindelse med denne metoden, se appendiks 5.

2.7.1 Utsåing og høsting av celler til qPCR

Cellene ble dyrket opp i 6-brønners brett som beskrevet i avsnitt 2.3. I de siste 48 timene av differensieringsperioden ble halvparten av cellene stimulert med elektriske impulser (se

avsnitt 2.4) før de ble høstet til qPCR. Som kontroll ble celler fra samme donorer benyttet, men uten EPS-stimulering. Høstingen bestod av å fjerne differensieringsmediet før cellene ble vasket to ganger med 2 ml PBS. Deretter ble 100 µl lysisbuffer fra Agilent Technologies tilsatt hver brønn. Cellene ble skrapet løst ved hjelp av en celledraper og cellelysatet ble overført til merkede eppendorfrør før de ble satt i -80 °C fryser.

2.7.2 Isolering av RNA

Prosedyren som ble brukt for isolering av RNA var Agilent Total RNA Isolation Protocol [78]. Prøvene ble tatt opp fra fryser og tint før 300 µl cellelysat fra hver donor ble sentrifugert gjennom en mini-prefiltrasjonsskolonne i 3 minutter ved 16 000 G. Dette ble gjort for å fjerne store proteiner og forurensninger fra filtratet. Deretter ble det tilsatt en tilsvarende mengde 70 % etanol til filtratet; dette ble blandet godt til løsningen ble homogen. Løsningen ble så inkubert i romtemperatur i 5 minutter. Videre ble løsningen overført til en mini-isolasjonsskolonne hvor den ble sentrifugert i 30 sekunder ved 16 000 G. Isolasjonsskolonnen ble vasket to ganger med 500 µl av tillaget vaskeløsning og sentrifugert i 30 sekunder ved 16 000 G. For å fjerne eventuelle rester av vaskeløsningen ble mini-isolasjonsskolonnen sentrifugert i 2 minutter ved 16 000 G. Tilslutt ble kolonnen tilsatt 20 µl nukleasefritt vann, og stod til inkubasjon i 1 minutt før den ble sentrifugert i 1 minutt ved 16 000 G for å eluere ut RNAet. Isolert RNA ble oppbevart ved -80 °C inntil videre cDNA-syntese.

2.7.3 Kvantifisering av RNA-konsentrasjonen

RNA-konsentrasjonen i hver prøve ble kvantifisert ved bruk av NanoDrop™ Lite spektrofotometer. Først ble det etablert en blank-prøve basert på nukleasefritt vann, før det ble tilsatt 2 µl av isolert RNA til proben og absorbansen ble målt ved 260 nm. NanoDrop™ Lite ga i tillegg et svar på renheten i prøven.

2.7.4 Syntese av cDNA

Komplementært DNA (cDNA) ble syntetisert fra mRNA ved bruk av revers transkriptase. Kittet som ble brukt i denne metoden var TaqMan Reverse Transcription Reagents. Det ble tatt ut et volum tilsvarende ≤ 1 µg RNA fra hver prøve og overført til et mini-eppendorfrør (MicroAmp®). Videre ble nukleasefritt vann tilsatt prøven til totalvolum 13,2 µl. Deretter ble 6,8 µl av reaksjonsblandingen (se appendiks 3.1) tilsatt hver prøve før eppendorfrørene ble plassert i Thermal Cycler 2720 for cDNA-syntese. Ferdig syntetisert cDNA ble lagret i fryser

ved -20 °C. De ulike betingelsene under syntesen var henholdsvis 25 °C i 10 minutter for heksamer/templat priming, 37 °C i 80 minutter for revers transkripsjon og tilslutt 85 °C i 5 minutter for inaktivering av revers transkriptase.

2.7.5 qPCR

qPCR gir en eksponentiell amplifisering av templat DNA, noe som gir en kvantitativ sammenheng mellom utgangskonsentrasjon av mRNA i de lyserte cellene og sluttkonsentrasjon av PCR-produktet. For å kunne detektere mengden av PCR-produktet ble SYBR-Green brukt som fluorescerende detektor. SYBR-Green vil binde seg uspesifikt til dobbeltrådet DNA og sende ut fluorescens som kan detekteres. Etter hvert som mengde DNA øker, vil mengde fluorescens øke.

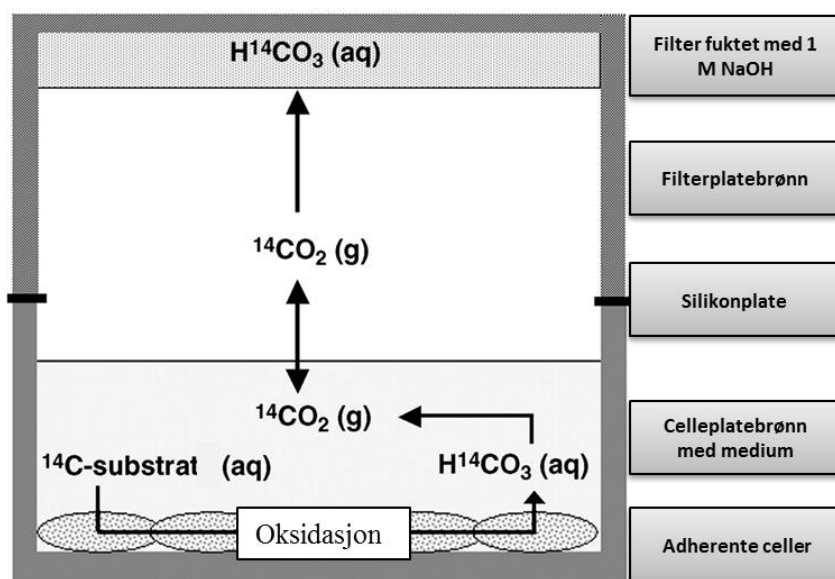
Det ble laget standarder med ulike konsentrasjoner av cDNA-miks (se appendiks 3.2). cDNA-miksen bestod av 1,6 µl fra hver prøve. Videre ble denne cDNA-miksen fortynnet med nukleasefritt vann i forholdet 1:5 og kalt standard 1000. Fra standard 1000 ble standard 200, 40 og 8 laget ved å bruke fortynningsrekker med fortynning 1:5. Nukleasefritt vann ble brukt som negativ kontroll. Før analysen ble alle primere fortynnet til 30 µmol/l (se appendiks 3.3), og cDNA-prøvene ble fortynnet 1:5 med nukleasefritt vann (se appendiks 3.4). Videre ble 2,5 µl av negativ kontroll, standarder og fortynnede cDNA-prøver overført til en MicroAmp[®] Optical Reaction Plate. Det ble så tilsatt 22,5 µl av SYBR Green PCR-miks (se appendiks 3.5) til hver brønn. PCR-miksen inneholdt ulike primere i forhold til hvilket gen som skulle kjøres. Brettet ble satt inn i ABI PRISM 7000 for analyse. 36B4 ble brukt som referanseggen. Referanseggenene ble brukt til å korrigere for variable mengder mRNA i prøvene. Mengde amplifisert cDNA i hver prøve ble beregnet ut i fra standardkurven.

Tabell 2.5: Oversikt over primere benyttet i qPCR.; 36B4, syreholdig ribosomalt fosfoprotein P0; CPT1b, karnitin palmitoyltransferase 1b; IL-6, interleukin 6; MYH7, myosin tung kjede-gen PDK4, pyruvat dehydrogenasekinase isoenzym 4; F, forward; R, reverse

Gen	Genbanknummer	Primere
36B4	M17885	F: 5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3' R: 5'-AGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
PDK4	BC040239	F: 5'-TTTCCAGAACCAACCAATTACAA-3' R: 5'-TGCCCGCATTGCATTCTTA-3'
IL-6	NM000600	F: 5'-CGGGAACGAAAGAAAGAGAAGCTCTAT-3' R: 5'-AGGCGCTTGTGGAGAAGGA-3'
CPT1b	L39211	F: 5'-CGGTGGAACAGAGGCTGAA-3' R: 5'-CGAGGCGATACATATGCTGATG-3'
MYH7	NM000257,2	F: 5'-CTCTGCACAGGGAAAATCTGAA-3' R: 5'-CCCCTGGAGACTTTGTCTCATT-3'

2.8 Substratoksidasjonsmetoden

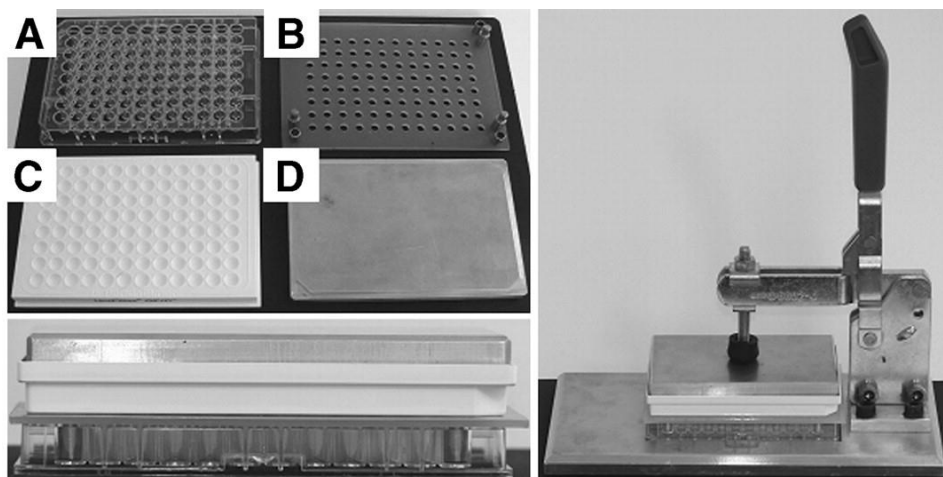
Substratoksidasjonsmetoden ble utviklet av Wensaas *et al.* [79] i 2007, og er en metode som gjør det mulig å måle mengden ^{14}C -merket substrat oksidert av skjelettmuskelcellene. Det ble benyttet to ulike medier i denne metoden, ett med D- $^{14}\text{C}(\text{U})$ glukose og ett med $[1-^{14}\text{C}]$ oljesyre (se appendiks 4). Teorien bak metoden er illustrert i figur 2.2, mens utstyret som ble brukt i metoden er fremstilt i figur 2.3.



Figur 2.2 Teorien bak substratoksidasjonsmetoden. Når ^{14}C -substratet blir oksidert av cellene produseres CO_2 som et avfallsprodukt. CO_2 -gassen blir fanget i det alkaliske filteret øverst i "sandwichen" og mengden kan detekteres. Det som ikke oksideres, vil akkumuleres i cellene i det nederste laget. Figuren er modifisert fra [79].

2.8.1 Substratoksidasjonsforsøket

Cellene ble dyrket opp i 96-brønners Corning® CellBIND®-brett som beskrevet i avsnitt 2.3. 48 timer før forsøk ble cellene tilsatt ulike kondisjonerte medier. De kondisjonerte mediene var differensieringsmedium som hadde blitt brukt på donorer i treningsstudien som enten var blitt stimulert med EPS eller bare fungerte som kontroll. Disse mediene ble samlet etter 24 og 48 timer. De kondisjonerte mediene ble blandet med differensieringsmediet i forholdet 1:1, og volumet i hver brønn ble totalt 200 µl. De ulike mediene ble fjernet før 50 µl radiomerket medium ble tilsatt. 96-brønnersbrettet ble festet i trappeholderen og en sikring ble satt i hvert hjørne. Silikonplaten ble lagt over brettet og sikringen ble låst fast. Filterbrettet som var fuktet med 1 mol/l NaOH ble lagt over silikonplaten og metallplaten ble lagt over filterbrettet. Denne ”sandwichen” ble låst sammen og satt til inkubering i 4 timer i inkubator ved 37 °C og 5 % CO₂.



Figur 2.3 Oversikt over utstyr brukt til substratoksidasjonsmetoden. A) 96-brønners Corning® CELLBIND® brett. B) Silikonplate med tilhørende metallskruer. C) UniFilter® 96-brønners brett fuktet med 1M NaOH. D) Metallplate for å kunne gi et jevnt trykk over hele brettet. Alle delene ble satt sammen til en ”sandwich” og festet som vist på bildet til høyre. Bildet er hentet fra [79].

Etter 4 timer ble trappingstativet tatt ut og delene tatt fra hverandre. Det radioaktive mediet ble fjernet og cellene ble vasket to ganger med 150 µl PBS. Deretter ble 150 µl 0,1 mol/l NaOH tilsatt for å lysere cellene. Brettet ble forseglet før det ble plassert i fryser ved -20 °C. Filterbrettet ble tilsatt 40 µl Optiphase Supermix tellervæske og dekket med TopSeal®-A plastikkfilm. Brettet fikk stå i 2 dager før CO₂ ble målt på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter.

2.8.2 Celleassosiert radioaktivitet

Celleassosiert radioaktivitet (CA) er et mål på hvor mye radioaktivitet som akkumuleres i cellene. Ved å måle både CA og CO₂ kan vi se på det totale opptaket i cellene ved å slå sammen resultatene fra begge målingene.

Cellebrettet og rester av de radioaktive mediene ble tatt opp fra fryseren og satt til tining i inkubatorskapet. Deretter ble 50 µl av lysatet fra hver brønn tatt ut og overført til et 96-brønners Isoplate™ brett (eget brett for CA-måling). De radioaktive mediene ble tilsatt i de tomme radene for kontrolltelling. 100 µl Optiphas Supermix tellervæske ble tilsatt hver brønn før brettet ble dekket med TopSeal®-A plastikkfilm. Brettet fikk videre stå i 2 timer før telling på Wallac 1450 Microbeta Plus Liquid Scintillation Counter.

2.8.3 Bradfords metode for proteinmåling

I 1976 utviklet Marion Bradford en rask og sensitiv metode for kvantifisering av protein [80]. Det er en spektrofotometrisk analytisk metode hvor hovedprinsippet baserer seg på at fargestoffet Coomassie Brilliant Blue G-250 skifter farge fra rødt til blått ved binding til protein. Ved endring av farge endres absorpsjonsmaksimum fra 465 nm til 595 nm [80].

Det lyserte cellebrettet og BSA-standarder ble satt i inkubatorskap for tining. Standardene bestod av bovint serumalbumin (BSA) i konsentrasjonene 0, 10, 20, 40, 80, og 160 µg/ml løst i 0,1 mol/l NaOH. 50 µl fra hver brønn ble overført til en 96-brønners mikrotiterplate. Videre ble det tilsatt 200 µl av Bio-Rad Protein Assay Reagent Concentrate (fortynnet 1:5) til hver brønn. Mikrotiterplaten fikk stå i 5 minutter før platen ble satt i Victor™ X4 Multilabel Plate Reader og absorbansen ble målt ved 595 nm. Ved hjelp av standardkurven kunne de ukjente proteinkonsentrasjonene estimeres.

2.9 Statistikk

For alle statistiske analyser i denne oppgaven ble dataprogrammet GraphPad Prism 6 benyttet. Alle dataene presenteres som gjennomsnittsverdi ± standardfeil (SEM). Gjennomsnittet for hver donor ble beregnet ut i fra 3 paralleller i qPCR- og glykogensynteseforskene. I substratoksidasjonsforskene ble det beregnet ut i fra 8-12 paralleller. I oppgaven er det benyttet paret ikke-parametrisk test (wilcoxon matched-pairs signed rank test). Det ble brukt et signifikansnivå på 5 % ($\alpha = 0,05$).

3 Resultater

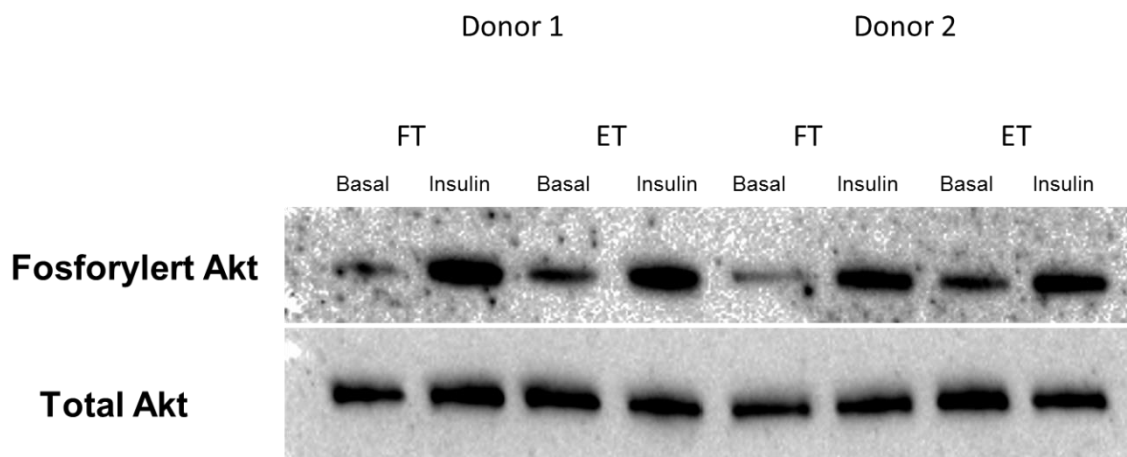
Alle resultater presentert i denne oppgaven er basert på forsøk med celler som ble dyrket opp som beskrevet i avsnitt 2.3.

3.1 Effekter av trening *in vivo* på insulinsensitivitet *in vitro*

In vivo viste deltakerne i treningsstudien en signifikant bedring i insulinsensitivitet etter trening (se tabell 2.1). Det var derfor ønskelig å se om denne effekten var bevart i humane myotuber *in vitro*. I denne oppgaven ble insulinresponsen undersøkt ved å se på viktige mediatorer i insulinsignalveien som Akt og IRS1. I tillegg ble glykogensyntese før og etter trening studert.

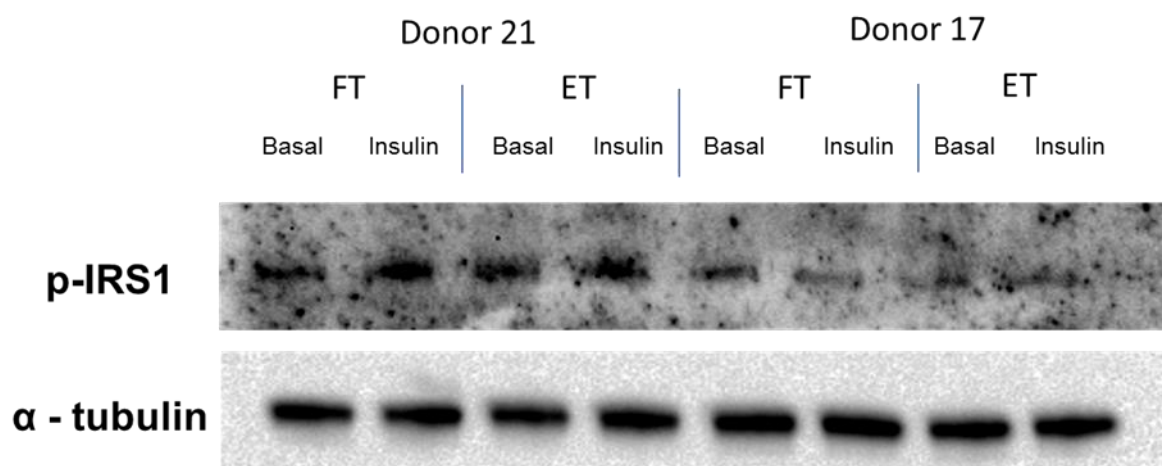
3.1.1 Effekt av trening og insulin på fosforylering av Akt og IRS1

For å undersøke om effekten av trening *in vivo* var bevart *in vitro* ble insulinfølsomheten studert med western (se avsnitt 2.6) ved å se på insulinindusert fosforylering av Akt. Akt er et viktig protein som blant annet regulerer GLUT4-translokasjon til cellemembranen og dermed medierer økt glukoseopptak [81] (se figur 1.2). Foruten insulinindusert fosforylering av Akt ble det også sett på Akt-fosforylering i fravær av insulin (basal). Resultater fra arbeidet er vist som et westernblott i figur 3.1.



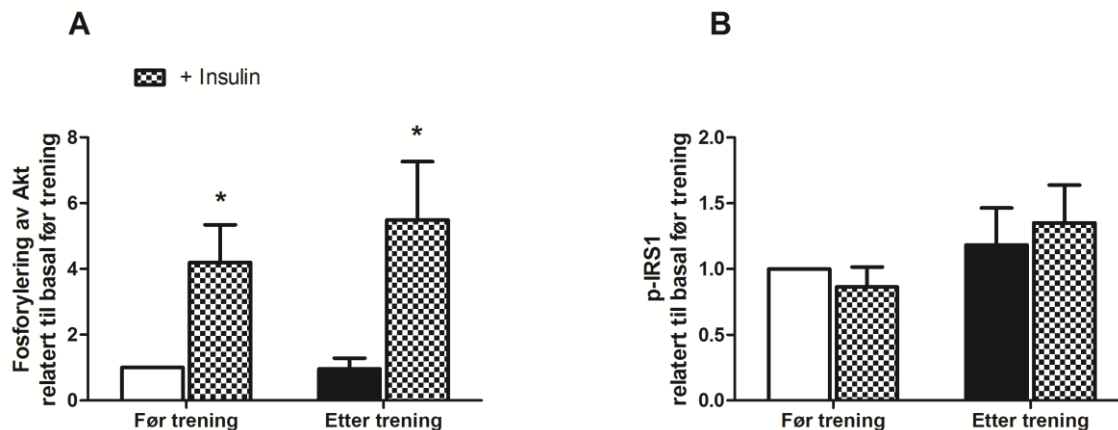
Figur 3.1: Westernblott fra donor 1 og 2 før og etter treningsintervensjonen. Blottet viser effekt av trening og insulin på fosforylert Akt og total Akt. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble cellene enten forbehandlet med 100 nmol/l insulin i 15 minutter eller kun behandlet med vanlig differensieringsmedium (basal). Etter forbehandlingen ble celler fra før (FT) og etter trening (ET) høstet samtidig. Deretter ble det kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokking og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot fosforylert Akt (Ser⁴⁷³) og total Akt (Akt1/2/3). Resultatet viser to donorer, henholdsvis donor 1 og 2.

I tillegg til å se på insulinfølsomheten ved Akt-fosforylering ble fosforylert IRS1 (p-IRS1) ved basal og insulinstimulerte forhold studert med western. p-IRS1 spiller en sentral rolle i insulin-signaleringsveien. Ved binding av insulin til insulinreseptoren aktiveres IRS-1 ved fosforylering og medierer videre aktivering av nedstrøms signalproteiner i insulin-signalveien [28]. Resultatet etter undersøkelse av p-IRS1 er vist som et westernblott i figur 3.2.



Figur 3.2: Westernblott for donor 21 og 17. Blottet viser effekt av trening og insulin på p-IRS1. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble cellene enten forbehandlet med 100 nmol/l insulin i 15 minutter eller behandlet med vanlig differensieringsmedium (basal). Etter forbehandlingen ble cellene fra før (FT) og etter trening (ET) høstet samtidig. Deretter ble det kjørt gelelektroforese og blotting over på membranen. Etter blokking og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot p-IRS1 (Tyr⁶³²) og α -tubulin. Resultatet viser to donorer, henholdsvis donor 17 og 21.

Westernblottene for fosforylert Akt og IRS1 ble kvantitert og resultatene er vist i figur 3.3.



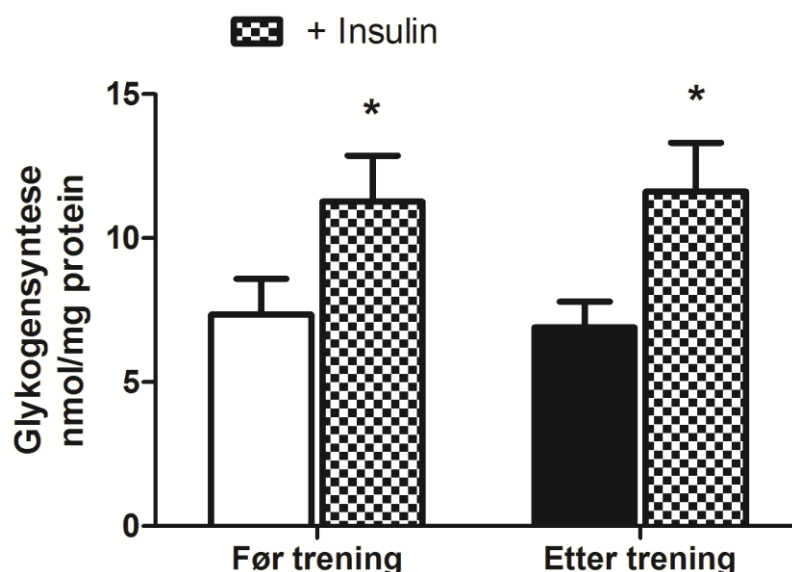
Figur 3.3: Effekt av trening *in vivo* på insulinstimulert fosforylering av Akt og IRS1 *in vitro*. Figurene viser effekten av trening med og uten forbehandling i 15 minutter med 100 nmol/l insulin. A) Effekt av trening og insulin på fosforylering av Akt. Verdiene er relatert til basal før trening (satt til 1) og presentert som fosforylert Akt relatert til total Akt. B) Effekt av trening og insulin på fosforylering av IRS1. Verdiene er relatert til basal før trening og presentert som fosforylert IRS1 relatert til α -tubulin. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM for fem uavhengige forsøk ($n = 5$) for fosforylering av Akt og fire uavhengige forsøk ($n = 4$) for p-IRS1. * $p < 0,05$ i forhold til basal (paret ikke-parametrisk test). Kvantiterte westernblott.

Som vist i figur 3.3A hadde ikke treningsintervensjonen noen effekt på nivåene av fosforylert Akt. Det ble observert en signifikant økning i fosforylering av Akt der insulin ble tilsatt. Det er mulig å se en tendens til økt insulinstimulert fosforylering av Akt etter treningsintervensjonen, men denne er ikke signifikant.

Figur 3.3B viser resultatet for p-IRS1. Det ses ingen effekt av treningsintervensjonen, selv om p-IRS1 etter trening er noe høyere enn før trening. Det ble heller ikke observert noen effekt av insulin.

3.1.2 Effekt av trening og insulin på glykogensyntese

Insulin spiller en viktig rolle i reguleringen av glukosemetabolismen og stimulerer blant annet til økt glykogensyntese ved å forhindre at glykogensyntase fosforyleres av GSK-3 [52]. Glykogensyntase katalyserer det siste trinnet i glykogensyntesen [82] (se avsnitt 1.8.1). Glykogensyntase er derfor et godt mål på insulinrespons. I denne oppgaven ble effekten av trening på glykogensyntese under basal og insulinstimulerte forhold studert. Glykogensyntesen ble målt ved bruk av radiomerket glukose som beskrevet i avsnitt 2.5. Resultatene er presentert i figur 3.4.

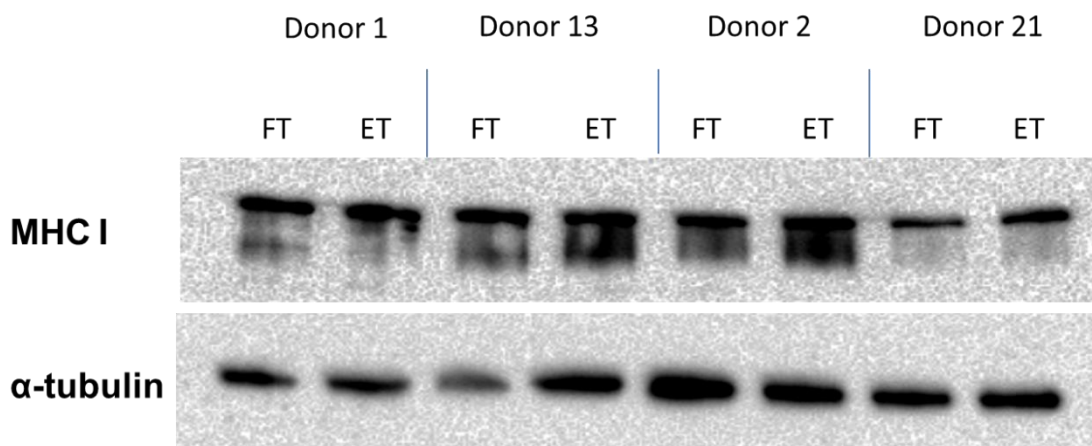


Figur 3.4: Effekt av trening *in vivo* på glykogensyntese *in vitro*. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble cellene inkubert med 0,17 mmol/l D-[^{14}C (U)]glukose og 0,5 mmol/l ikke-radioaktiv glukose med eller uten 100 nmol/l insulin. Cellene ble høstet etter 3 timer og glykogensyntese ble analysert. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM for seks uavhengige forsøk ($n = 6$). * $p < 0,05$ i forhold til basal (paret ikke-parametrisk test).

Det var ingen endring i glykogensyntese som følge av treningsintervensjonen (figur 3.4). Insulin førte til en signifikant økning i glykogensyntese i forhold til basal i celler fra både før og etter treningsintervensjonen.

3.2 Effekt av trening *in vivo* på proteinuttrykk av MHC-I (type 1-fibre) *in vitro*

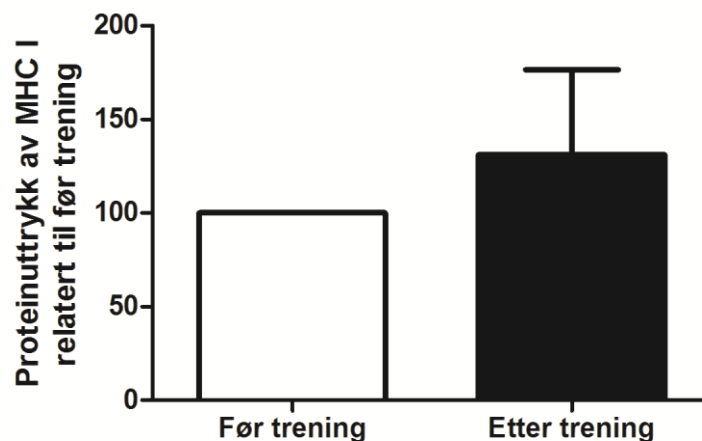
Muskelfibre hos mennesker blir generelt delt inn i langsomme oksidative (type 1), raske oksidative (type 2a) og raske glykolytiske (type 2x) -fibre. Det er tidligere vist at trening kan endre fibertype 2a til 2x og vice versa. Endring fra raske type 2-fibre til langsomme oksidative type 1-fibre er mer omdiskutert [83]. Proteinuttrykket av MHC-I i myotuber dyrket fra celler isolert før og etter treningsintervensjonen ble undersøkt med westernblotting. MHC-I er en markør for langsomme oksidative muskelfibre. Resultater fra arbeidet som er gjort er vist i figur 3.5 og 3.6.



Figur 3.5: Effekt av trening på proteinuttrykk av MHC-I. Etter 7 dager i differensieringsmedium ble cellene fra henholdsvis før (FT) og etter trening (ET) høstet samtidig. Deretter ble det kjørt gelelektroforese og blotting over på membranene. Etter blokkering og vasking ble membranene tilsatt antistoffer mot MHC-I og α -tubulin. Resultatene viser fire donorer, henholdsvis 1, 2, 13 og 21.

Proteinuttrykket av MHC-I ble kvantitert ut fra westernblottene og effekt av 12 ukers treningsintervensjon *in vivo* på MHC-I-nivået *in vitro* vises i figur 3.6.

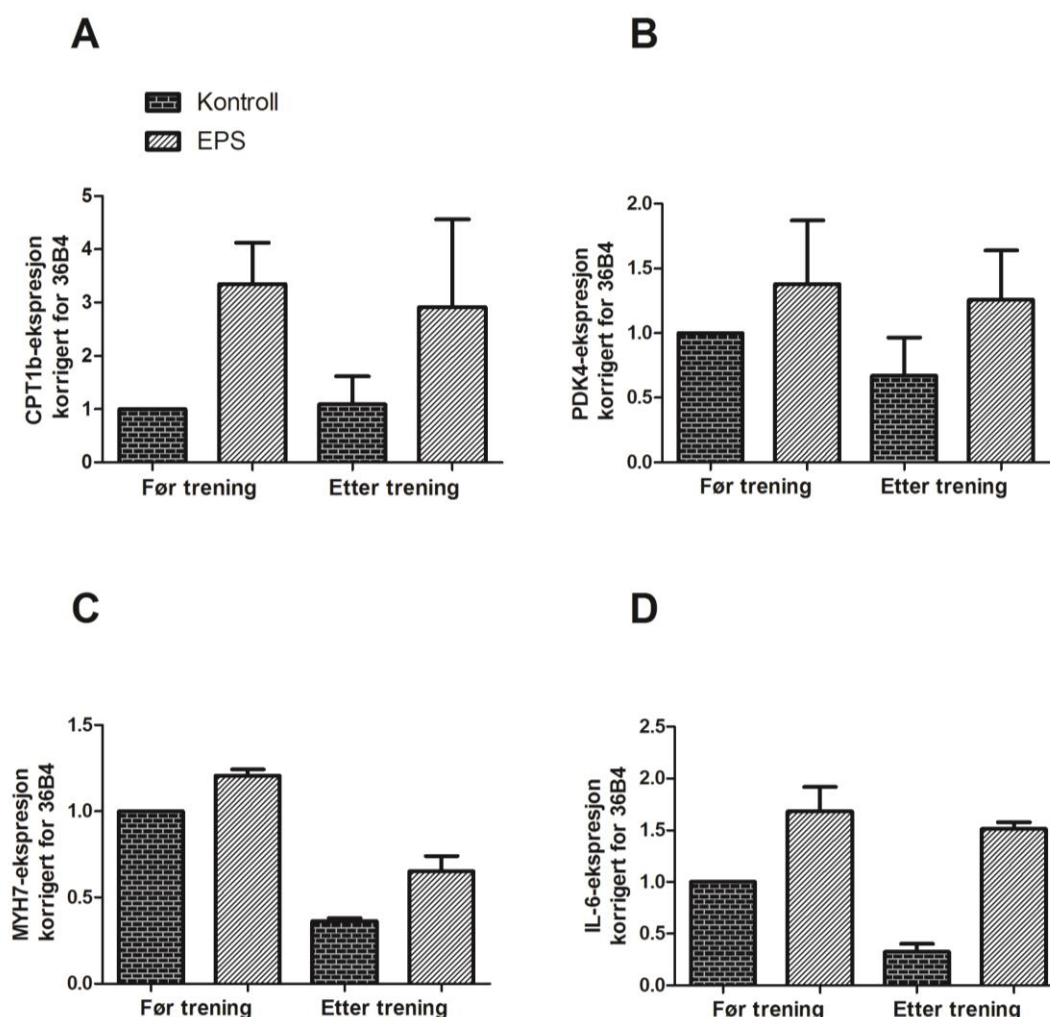
Det ble ikke observert endret proteinuttrykk av MHC-I som følge av treningsintervensjonen (figur 3.6).



Figur 3.6: Effekt av trening på proteinuttrykket av MHC-I. Figuren viser proteinuttrykket av MHC-I før og etter treningsintervensjonen. Resultatet er normalisert og presentert som gjennomsnitt \pm SEM for fem uavhengige forsøk ($n = 5$). Kvantiterte westernblott.

3.3 Effekt av trening *in vitro* på genekspresjon

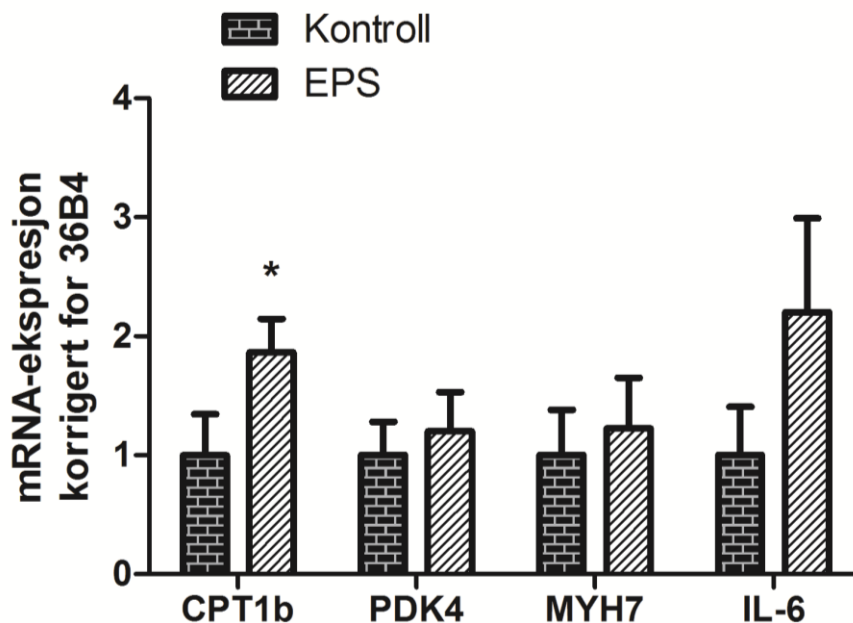
Det er tidligere vist at muskelkontraksjoner påvirker ekspresjon av gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel [40]. EPS er en modell for trening av skjelettmuskelceller *in vitro*. Nikolić *et al.* har tidligere vist at EPS-stimulering kan ha effekt på genekspresjonen i humane myotuber [49]. Det var derfor av interesse å se om trening *in vivo* påvirket cellenes responsivitet til EPS med hensyn på ekspresjonen av gener som er involvert i fettsyre- og glukosemetabolismen, samt genekspresjon av muskelfibertype 1. Cellene ble behandlet *in vitro* med EPS-stimulering i 48 timer før høsting. De ulike genene som ble studert var MYH7, PDK4, IL-6 og CPT1b. Den endogene kontrollen som ble brukt var 36B4. Det ble sett på effekt av både trening *in vivo* og *in vitro* (etter EPS) på to donorer, donor 2 og 21. Resultatene vises i figur 3.7.



Figur 3.7: Effekt av *in vivo* trening og EPS på genuttrykk. mRNA-ekspresjon av CPT1b (A), PDK4 (B) MYH7 (C) og IL-6 (D). CPT1b, karnitin palmitoyltransferase 1b; IL-6, interleukin 6; MYH7, myosin tung kjede-gen; PDK4, pyruvat dehydrogenasekinase isoenzym 4. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM for to uavhengige forsøk ($n = 2$, donor 2 og 21). Resultatene er normalisert og korrigert for 36B4.

Som vist i figur 3.7 var det ingen effekt av trening *in vivo* på ekspresjonen av de genene som ble undersøkt. Genekspresjonen av PDK4, MYH7 og IL-6 i myotuber etter treningsintervensjonen (uten EPS) så ut til å ligge lavere enn i myotuber fra før treningsintervensjonen (uten EPS). Samtidig så EPS-stimulering ut til å kunne gi økt ekspresjon av alle genene i forhold til kontroll i myotuber fra både før og etter treningsintervensjonen. Responsen av EPS var høyere etter trening for ekspresjonen av PDK4, MYH7 og IL-6 (B, C, D) sammenlignet med før trening.

Figur 3.8 viser effekt av EPS i forhold til kontroll på ekspresjonen av gener i humane myotuber. På grunn av få donorer ble ikke donorene splittet i før og etter trening, men sett på samlet som en gruppe.



Figur 3.8: Effekt av EPS på genuttrykk. Cellene ble høstet etter 7 dager i differensieringsmedium. Cellene ble stimulert \pm EPS i 48 timer før høsting. mRNA-ekspresjonen er korrigert for 36B4. Resultatene er normalisert og korrigert for 36B4. Dataene er presentert som gjennomsnitt \pm SEM for CPT1b (n = 7), PDK4 (n = 7), MYH7 (n = 6) og IL-6 (n = 6). * $p < 0,05$ i forhold til kontroll (uten EPS) (paret ikke-parametrisk test).

Figur 3.8 viser en signifikant EPS-indusert ekspresjon av CPT1b sammenlignet med kontroll. Ekspresjon av IL-6 viste en tendens til økning etter EPS-stimulering ($p = 0,063$), mens ekspresjonen av PDK4 og MYH7 var uendret etter EPS-stimulering.

3.4 Effekt av behandling med kondisjonert medium på oljesyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber

Skjelettmuskel har nylig blitt identifisert som et endokrint organ som produserer og frigjør cytokiner, kalt myokiner [50, 84]. Under muskelkontraksjon produseres IL-6 som muligens har flere positive effekter på energimetabolismen [50]. Flere andre myokiner er også blitt identifisert [48]. Det var derfor av interesse å studere om muskelceller ved EPS-stimulering skiller ut myokiner som påvirker oljesyre- og glukosemetabolismen *in vitro*. Kondisjonert medium (siste 48 timer i differensieringen) fra muskelceller som var behandlet med eller uten EPS ble brukt på humane myotuber. Donoren til de kondisjonerte mediene kom fra treningsstudien (se avsnitt 2.2.1) og medium fra både før og etter treningsintervensjonen ble produsert av samme donor (donor 21). De ulike kondisjonerte mediene ble samlet inn etter 24 og 48 timer (tabell 3.1).

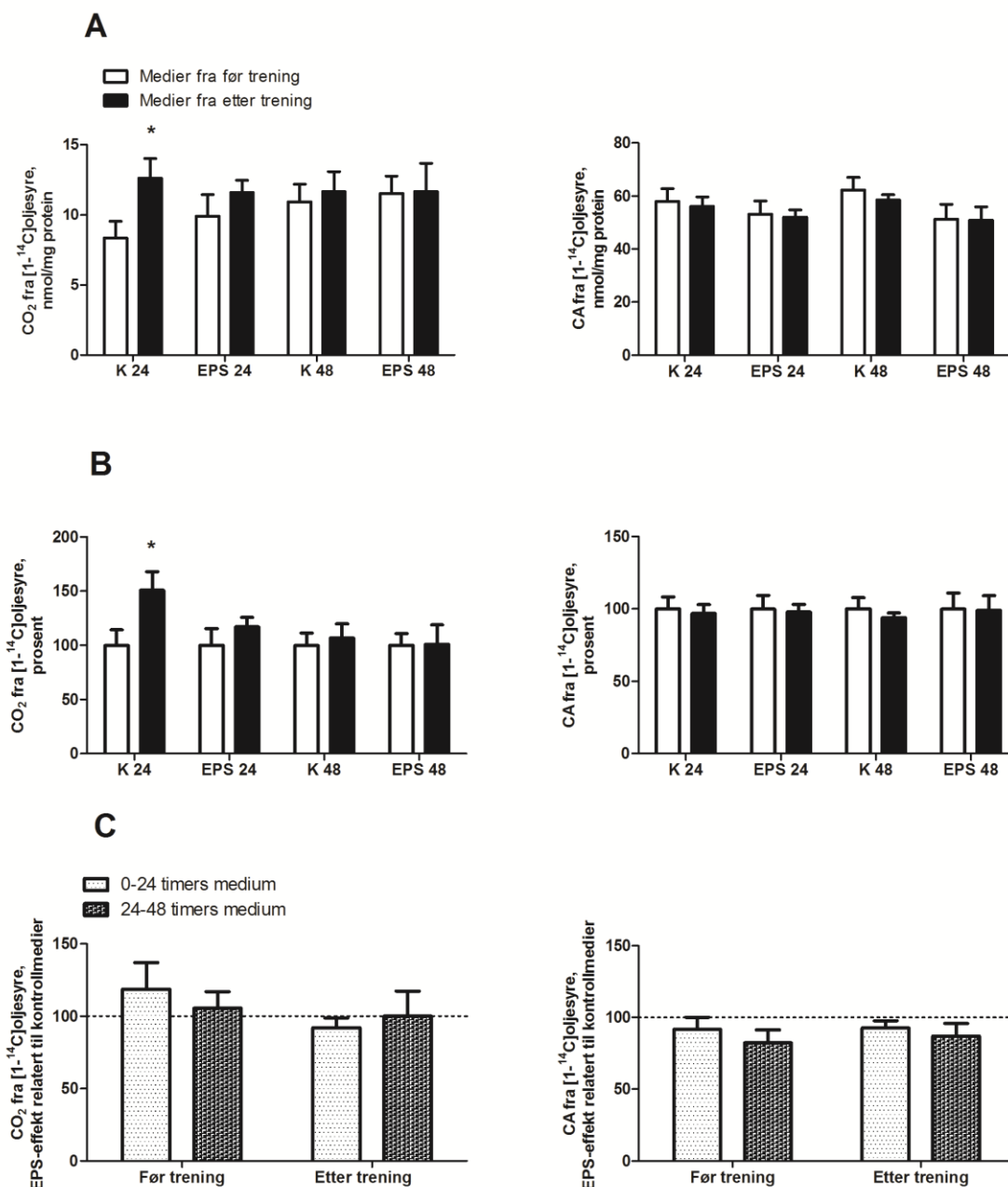
Tabell 3.1: Oversikt over de ulike kondisjonerte mediene benyttet i substratoksidasjonsforsøkene.

Kondisjonerte medier samlet fra celler før og etter treningsintervensjonen de siste 48 timene av differensieringsperioden

K 24	Kontrollmedium samlet etter 0-24 timer
EPS 24	EPS-medium samlet etter 0-24 timer
K 48	Kontrollmedium samlet etter 24-48 timer
EPS 48	EPS-medium samlet etter 24-48 timer

EPS: elektrisk pulsstimulering; K, kontroll

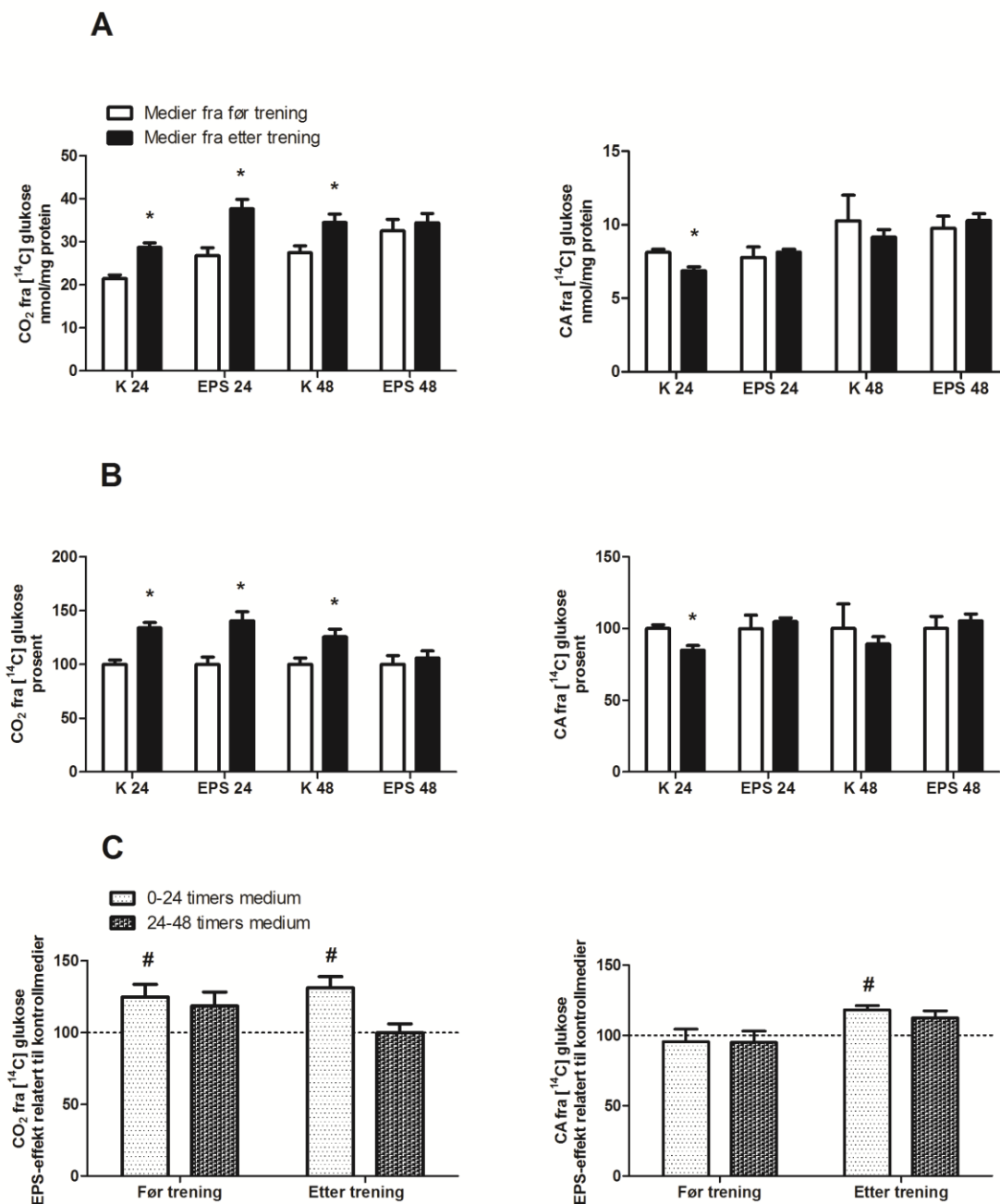
Effekten av kondisjonert medium på oljesyre- og glukosemetabolismen ble undersøkt i humane myotuber ved å se på oksidasjon (CO₂-produksjon) og celleassosiert radioaktivitet (CA) fra radiomerket oljesyre (figur 3.9) og glukose (figur 3.10). Myotubene som ble benyttet til å studere effekter av kondisjonert medium kom fra friske personer (se tabell 2.4) som ikke deltok i treningsstudien. Resultatene er presentert i figur 3.9 og 3.10.



Figur 3.9: Effekt av kondisjonerte medier på oljesyremetabolismen i humane myotuber. Myotubene ble kun behandlet med de ulike kondisjonerte mediene vist i tabell 3.1. A) Absoluttverdier for CO₂ og celleassosiert radioaktivitet (CA). B) Relative verdier for CO₂ og CA. Verdier fra før trening er satt til 100 %. C) Effekt av medium fra elektrisk pulsstimulering (EPS-medium) relatert til kontrollmedium. Verdier fra kontrollmedium uten EPS er satt til 100 % (stiplet linje). 24, kondisjonert medium samlet etter 24 timer; 48, kondisjonert medium samlet etter 48 timer; EPS, elektrisk puls-stimulering; K, kontroll. Resultatene er basert på 3 forsøk med til sammen 12 brønner (n = 12). * p < 0,05 i forhold til før trening (paret ikke-parametrisk test).

Det var signifikant økt oljesyreoksidasjon i myotuber som ble inkubert med K24 fra etter treningsintervensjonen sammenlignet med K24 fra før treningsintervensjonen (figur 3.9 A og B). Det var ingen tilleggseffekt av EPS-medium i forhold til kontrollmedium på

oljesyreoksidasjonen og heller ingen effekt av behandlingen med noen kondisjonerte medier på celleassosiert oljesyre.



Figur 3.10: Effekt av kondisjonerte medier på glukosemetabolismen i humane myotuber. Myotubene ble kun behandlet med de ulike kondisjonerte mediene vist i tabell 3.1. A) Absoluttverdier for CO₂ og celleassosiert radioaktivitet (CA). B) Relative verdier for CO₂ og CA. Verdier fra før trening er satt til 100 %. C) Effekt av medium fra elektrisk pulsstimulering (EPS-medium) relatert til kontrollmedium. Verdier fra kontrollmedium uten EPS er satt til 100 % (stiplet linje). 24, kondisjonert medium samlet etter 24 timer; 48, kondisjonert medium samlet etter 48 timer; EPS, elektrisk puls-stimulering; K, kontroll. Resultatene er basert på 2 forsøk med til sammen 8 brønner (n = 8). * p < 0,05 i forhold til før trening, # p < 0,05 i forhold til kontrollmedium (uten EPS-stimulering) (paret ikke-parametrisk test).

Oksidasjon av glukose var signifikant økt i myotuber inkubert med K24, K48 og EPS48 fra etter treningsintervensjonen sammenlignet med medier fra før treningsintervensjonen (figur 3.10A og B). Celleassosiert glukose var signifikant lavere i myotuber etter inkubering med K24 fra celler etter trening sammenlignet med K24 fra celler dyrket før trening (figur 3.10A og B). Kondisjonert EPS-medium samlet etter 0-24 timer viste signifikant økt oksidasjon av glukose både før og etter trening *in vivo* i forhold til kondisjonert kontrollmedium. I tillegg ga kondisjonert EPS-medium samlet etter 0-24 timer signifikant økt celleassosiert glukose etter trening sammenlignet med kondisjonert kontrollmedium (figur 3.10C)

4 Diskusjon

4.1 Treningsintervensjonen

Effekt av trening *in vivo* avhenger av treningstype, intensitet og varighet. Mange av de fysiologiske tilpasningene i skjelettmuskel avhenger av hvilken treningsform som utøves [85]. I denne treningsstudien var deltakerne gjennom en lik mengde av styrke- og utholdenhetstrening. Det er godt kjent at utholdenhetstrening fører til økt mitokondriell biogenese og gir en forbedret oksidativ kapasitet i muskel [85]. Samtidig kan glykogenlagringskapasiteten økes og valg av energisubstrat kan skifte fra glykogen til fett under mindre intensive treningsøkter. Styrketrening stimulerer til muskelvekst og økt proteinsyntese [85]. Effekt av treningsintervensjonen ble målt med ulike tester for styrke, utholdenhet og insulinsensitivitet (se tabell 2.3). I forhold til styrke- og utholdenhetstestene kan resultatet påvirkes av alt fra dagsform og oppladning, til motivasjon og psyke. Insulinsensitivitet ble målt ved hjelp av euglykemisk clamp. Deltakerne gjennomførte treningsintervensjonen på en god måte og viste i gjennomsnitt en signifikant forbedring i styrke, utholdenhet og insulinsensitivitet. Effekt av treningen var en forutsetning for å kunne studere om responsen *in vivo* var blitt bevart og påvirket energimetabolismen *in vitro*.

4.2 Fra satellittceller til humane myotuber – modell for skjelettmuskelceller *in vitro*

Satellittceller ble isolert fra skjelettmuskelbiopsier. Som beskrevet tidligere kan satellittceller aktiveres og dyrkes opp til myoblaster før de videre kan differensiere til flerkjernede myotuber. I løpet av de siste 30 årene har denne typen celler blitt brukt som modell for å studere glukose og fettsyremetabolismen *in vitro*. Uttrykket av proteiner som er viktig i glukose- og fettsyremetabolismen øker under differensiering av myoblaster til myotuber. Proteinuttrykket i myotuber ligner mer på human skjelettmuskel *in vivo* og er derfor foretrukket å gjøre forsøk på [36]. Ulemper med cellemodellen er blant annet at det insulin-stimulerte glukoseopptaket er lavere i myotuber sammenlignet med situasjonen *in vivo*. Khalili *et al.* viste at dette blant annet kan skyldes at proteinuttrykket av GLUT4 er lavere i myotuber *in vitro* enn i skjelettmuskel *in vivo* [86]. I cellemodellen vil ikke fysiologiske faktorer som det komplekse ekstracellulære miljøet og endokrin påvirkning være tilstede. Det

samme gjelder for kommunikasjon som foregår med andre celler. Derimot kan det ekstracellulære miljøet kontrolleres nøye. Sammenlignet med skjelettmuskelceller fra dyr gir humane satellittceller det beste genetiske grunnlaget for å undersøke sykdommer relatert til metabolsk dysfunksjon. Mange metabolske karakteristikk fra donorene blir bevart når satellittcellene dyrkes opp *in vitro*. Gaster *et al.* demonstrerte dette ved å vise at den diabetiske fenotypen fra donorer med T2D var bevart *in vitro* [87]. Denne oppgaven har sett på om effekt av trening *in vivo* er bevart i celler *in vitro*. I forhold til dette må det presiseres at satellittcellene selv ikke har kontrahert. Disse cellene ligger i en hvilende tilstand i muskelen *in vivo*. Det er likevel naturlig å tro at cellene blir påvirket av signaler fra de kontraherende muskelcellene. Tidligere er det vist at effekt av trening *in vivo* er bevart i humane myotuber *in vitro*. Bourlier *et al.* dyrket opp satellittceller fra biopsier tatt før og etter en 8 ukers treningsintervensjon. Deltakerne som deltok i studien var middelaldrende menn med $KMI \geq 30 \text{ kg/m}^2$ og de gjennomførte en treningsintervensjon som i hovedsak bestod av sykling eller løping. Resultatene fra denne studien viste at trenings-induserte endringer i glukosemetabolismen var bevart i cellekulturer *in vitro* [75]. Studien til Bourlier *et al.* inkluderte kun 5 deltakere noe som er lavt og det kreves flere studier for å kunne trekke sikre konklusjoner. Uansett tydet resultatene på at myotuber dyrket opp fra satellittcellene husket trenings-induserte endringer *in vitro*. Dette indikerer at satellittceller kan brukes som en *in vitro* modell etter trening *in vivo*.

Fra muskelbiopsien ble det isolert relativt få satellittceller. Videre ble satellittcellene dyrket opp til myoblaster, hvoretter cellene ble lagret i flytende nitrogen. Det ble brukt samme celledyrkningsprosedyre for alle cellene i denne oppgaven. Replikasjonspotensialet til myoblastene er begrenset og reduseres som følge av passasjenummer. Samtidig vil kapasiteten myoblastene har for videre differensiering til myotuber reduseres. Flere metabolske prosesser blir gradvis redusert som følge av økende passasjenummer [88]. I denne oppgaven ble celler fra passasje 2 og 3 benyttet. Dette er celler fra omtrent samme passasje og gir dermed ingen grunnlag til å forvente forskjellige respons basert på passasjenummer. Samtidig er det celler fra lav passasje noe som gir et godt utgangspunkt for at cellene har bevart mange av sine opprinnelige egenskaper.

I utgangspunktet ble ikke alle planlagte forsøk gjennomført grunnet utfordringer med oppdyrkingen av cellene. Det er derfor ikke gjort forsøk på alle donorene, noe som medførte at det er et ulikt antall donorer i de forskjellige forsøkene.

4.3 Effekt av trening på proteinuttrykk av type 1-fibre

Resultatet viste at treningsintervensjonen ikke ga signifikant endring av proteinuttrykket av fibertype 1 (MHC-I), en markør for langsomme muskelfibre (figur 3.6). Tidligere har *in vivo*-studier på human skjelettmuskel vist at trening kan endre fibertype 2a til 2x og *vica versa* [83]. Samtidig har celler behandlet med EPS *in vitro* vist å kunne gi et høyere proteinuttrykk av MHC-I, noe som kan tyde på et skifte i fibertype [49]. Fibertypene har ulike egenskaper og det er blant annet vist at enzymatisk kapasitet for glukoseopptak, fosforylering og oksidasjon samt glykogensyntese er høyere i type 1-fibre [37].

Det er flere *in vivo*-studier som antyder at et skifte fra type 2 til type 1-fibre i human skjelettmuskel potensielt er mulig [83]. Det er viktig å påpeke at fibertypesammensetning i mennesker utvikles over tid. Det er vist at sprintere som er avhengig av eksplosiv rask muskulatur i hovedsak uttrykker raske type 2-fibre, mens utholdenhetsutøvere som er avhengig av en utholdende muskulatur i hovedsak uttrykker langsomme type 1-fibre [83]. Dette har sammenheng med mange år med trening mens treningsintervensjonen deltakerne gjennomførte i denne studien kun varte i 12 uker. I denne oppgaven har vi ikke *in vivo*-data på fibertypesammensetning og vet derfor ikke om det forekom endringer i sammensetningen etter treningsintervensjonen. Vi tar derfor utgangspunkt i cellene *in vitro*. I disse så vi ingen endring i proteinuttrykk av MHC-I og ut i fra dataene er det lite som tyder på et skifte i fibertype. For å oppnå en effekt på proteinuttrykk av fibertype 1 kreves det mest sannsynlig en betydelig lengre periode med trening. Deltakerne i denne studien er godt voksne og det er rimelig å tro at en endring i fibertype kommer lettere hos yngre mennesker. En annen faktor som kan påvirke resultatet fra dette forsøket er cellemodellen som benyttes. Bonavaud *et al.* viste at satellittceller ikke er programmert til en bestemt fibertype, men uttrykker både langsomme type 1-fibre og raske type 2-fibre [89]. Dette kan tyde på at fibertypeuttrykk kan være forskjellig fra donor *in vivo* til de dyrkede myotubene *in vitro*.

4.4 Effekt av trening *in vitro* på genekspressjonen

Resultatene fra qPCR-forsøkene viste at trening *in vitro* i form av EPS-stimulering ga en signifikant økning i mRNA-ekspressjon av CPT1b (se figur 3.8). Samtidig viste resultatene en tendens til økning av IL-6 ($p = 0,063$). Resultatene for PDK4 og MYH7 viste ingen signifikante endringer. Nikolić *et al.* har tidligere demonstrert at EPS-stimulering har effekt på genekspressjonen i humane myotuber, hvor signifikant økning i mRNA-ekspressjonen av

PDK4 ble funnet. Samtidig viste mRNA-ekspresjonen av CPT1b, MYH7 og IL-6 tendenser til økning [49]. Resultatene funnet i denne oppgaven samsvarer godt med det som tidligere er funnet. CPT1b som spiller en viktig rolle i transporten av fettsyrer inn i mitokondriene er tidligere vist å være forhøyet etter trening *in vivo* [90]. IL-6 er klassifisert som et myokin som skilles ut fra kontraherende muskel (se avsnitt 1.7.1). Nivåene av IL-6 kan øke betydelig under muskelkontraksjoner. I en studie utført av Lambernd *et al.* førte EPS-stimulering av humane myotuber til økt IL-6 sekresjon, lignende effekten av trening *in vivo* [91]. Det var derfor nærliggende å tro at mRNA-ekspresjonen av IL-6 ville øke under EPS-stimulering. I figur 3.7 ble effekt av trening *in vivo* på cellenes responsivitet til EPS undersøkt. EPS-stimulering av cellene ser ut til å gi økt ekspresjon i forhold til kontroll. Samtidig ligger kontrollverdiene (uten EPS) lavere etter treningsintervensjonen for PDK4, MYH7 og IL-6 i forhold til før treningsintervensjonen. For de samme tre genene ser det ut til at reponsen av EPS er høyere etter trening i forhold til før trening. På grunn av utfordringer knyttet til dyrking av cellene ble ikke celler fra før og etter trening parett i særlig grad. Dataene vist i figur 3.7 stammer fra kun to donorer og det kan derfor ikke regnes statistikk på resultatene. Flere forsøk er nødvendig for å kunne trekke en konklusjon.

4.5 Effekter av trening på insulinsensitivitet

Etter treningsintervensjonen hadde deltakerne en signifikant forbedring i insulinfølsomhet. Om denne effekten var bevart *in vitro* ble studert på tre ulike måter, på insulinstimulert fosforylering av Akt, på insulinstimulert fosforylering av IRS1 og på insulinstimulert glykogensyntese. I oppgaven ble det kun benyttet en insulinkonsentrasjon på 100 nmol/l. Denne insulinkonsentrasjonen er betydelig høyere enn den fysiologiske konsentrasjonen, som ligger i størrelsesorden pmol/l. Det er tidligere vist at effekten av insulin i humane myotuber er lavere enn for intakt skjelettmuskel og det kreves derfor en høyere konsentrasjon av insulin for å kunne studere insulin-induserte prosesser i humane myotuber. Konsentrasjonen av insulin som brukes i *in vitro*-studier ligger ofte i området 0,1-1 $\mu\text{mol/l}$ [36].

I forsøkene med aktivering av Akt (se figur 3.3A) viste resultatene at forbehandling med insulin signifikant økte fosforyleringen av Akt på Ser⁴⁷³ både før og etter treningsintervensjonen. Dette er i samsvar med tidligere *in vivo*-studier som er gjort [92, 93]. I tillegg ble det sett en tendens til økning i insulin-indusert fosforylering av Akt etter trening. Denne var ikke signifikant, men kan tyde på at effekten av trening på insulinfølsomheten

delvis er bevart i humane myotuber *in vitro*. Det er mulig at en eventuell effekt av treningsintervensjon på insulin-indusert fosforylering av Akt vil være liten, og det ville vært ønskelig å gjøre forsøk på flere donorer. I dette tilfellet var antall donorer 5. Akt har to fosforyleringssteder, Tre^{308} og Ser^{473} , hvor fosforylering på begge setene er viktig for full aktivering [94]. I dette forsøket så vi på fosforylering av Akt på Ser^{473} . Det er ikke tidligere publisert studier på om trening har effekt på basal og insulinstimulert fosforylering av Akt i cellekulturer. Det er derimot gjort flere *in vivo*-studier hvor muskelbiopsier har blitt benyttet. Det er tidligere sett at trening kan forbedre insulinsensitiviteten i flere timer etter at treningen er opphørt. Levinger *et al.* viste at en treningsøkt med høy intensitet ga økt fosforylering av Akt (Ser^{473}) ved insulin-stimulerte forhold [95]. I en *in vivo*-studie utført av Ryan *et al.* gjennomførte deltakerne en 6-måneders lang treningsintervensjon. Fosforylering av Akt økte signifikant under insulin-stimulerte forhold, men det var ingen økning etter treningsintervensjonen [92]. Ved kun å se på effekt av trening på fosforylering av Akt fant Deldicque *et al.* at fosforylering av Tre^{308} og Ser^{473} var signifikant redusert i biopsier tatt rett etter intensiv styrketrening. Biopsier fra 24 timer etter trening viste at fosforyleringen av Ser^{473} retunerte til basalnivå, mens Tre^{308} fortsatt var redusert [96]. I en annen studie ble skjelettmuskel fra rotte isolert henholdsvis umiddelbart og to timer etter en kombinasjon av styrke og utholdenhetstrening. Skjelettmuskelcellene isolert to timer etter trening viste en signifikant økt fosforylering av Akt (Ser^{473}) [97].

Resultatene for insulinstimulert fosforylering av IRS1 er vist i figur 3.3B. Det ble ikke sett noen effekt av trening eller insulin på fosforylering av IRS1 på Tyr^{632} . Dette var overraskende da det var forventet å se en insulineffekt fordi binding av insulin til insulinreseptoren fosforylerer og aktiverer IRS1 [25]. Det var tydelig insulineffekt på fosforylert Akt hvor det ble benyttet samme prøver som for IRS1. Resultatet kan skyldes et dårlig antistoff. Det ble benyttet et polyklont antistoff, noe som kan gi stor grad av uspesifikk binding og bidra til bakgrunnsstøy (se figur 3.2 for westernblott). IRS1 er en viktig mediator i insulinsignalveien som kan fosforyleres på flere steder og aktivere nedstrøms signalproteiner i insulin-signalveien [28]. I en studie utført av Long *et al.* på skjelettmuskel fra mus ble det funnet at IRS1 spiller en signifikant rolle i forbindelse med fosforyleringen av Akt [30]. Det er tidligere vist at fosforylering av IRS1 på Tyr^{632} øker under insulin-stimulerte forhold i humane myotuber *in vitro* [98].

I denne oppgaven ble det ikke observert forskjell i myotuber fra før og etter trening på insulinstimulert glykogensyntese. Det ble sett en signifikant økt glykogensyntese ved insulinstimulerte forhold sammenlignet med basal. Dette gjaldt både før og etter trening. Insulin stimulerer til økt glukoseopptak og aktiverer glykogensyntase (se avsnitt 1.8.1) noe som fører til økt glykogensyntese [52]. I flere *in vitro*-studier er det vist at insulin stimulerer til en dobling av glykogensyntese i forhold til basal [86, 99, 100]. Dette er i samsvar med resultatene funnet i denne oppgaven. Samtidig er det vist i flere *in vivo*-studier at glykogenlagrene utnyttes ved fysisk aktivitet og at de raskt bygges opp igjen etter trening [93, 101]. Trening kan øke lagringskapasiteten av glykogen i skjelettmuskel. Dette reflekteres i at trente individer har et høyere glykogeninnhold i skjelettmuskel enn utrente individer [26, 63]. Selv om vi ikke fant en endring i glykogensyntese *in vitro* som følge av treningsintervensjonen er det tidligere vist i *in vivo*-studier at konsentrasjonen av glykogen kan øke som følge av trening [102-104]. I forhold til treningsmengde og varighet har disse studiene en kortere varighet, men samtidig har treningen vært mer intensiv enn i vår treningsstudie.

4.6 Effekt av kondisjonert medium på oljesyre- og glukosemetabolismen i humane myotuber

Behandling med kondisjonert medium, både fra kontrollmyotuber og myotuber behandlet med EPS, så ikke ut til å ha effekt på oljesyremetabolismen. Selv om K24 (se tabell 3.1) ga signifikant økt oksidasjon etter treningsintervensjonen var det ingen effekt fra andre medier på oljesyremetabolismen (CA og CO₂). Effekter av kondisjonert medium på glukosemetabolismen ga derimot interessante resultater (figur 3.10). Det ble observert at både kondisjonert EPS- og kontrollmedium påvirket glukosemetabolismen i humane myotuber. Oksidasjonen av glukose var signifikant økt i både kondisjonerte EPS- og kontrollmedier etter treningsintervensjonen. Samtidig så det ut til at kondisjonerte EPS-medier i flere tilfeller ga økt oksidasjon og celleassosiert glukose sammenlignet med kontrollmedium.

Skjelettmuskel har nylig vist seg som et endokrint organ hvor flere myokiner er identifisert [51]. IL-6 er et myokin som skilles ut fra kontraherende muskel og har muligens flere positive effekter på energimetabolismen [50]. Under EPS-stimulering produseres og frigis IL-6, som tilfellet er for kontraksjon *in vivo*. I en studie utført av Lambernd *et al.* ble det vist at sekresjonen av IL-6 ved EPS-stimulering var høyest de første 8 timene av behandlingen [91].

Ved vår forskningsgruppe er det gjort studier i humane myotuber på sekresjonen av IL-6 i forhold til kontroll- og EPS-behandling. Resultatet fra disse forsøkene viste ingen forskjell på EPS og kontroll i forhold til sekresjon av IL-6, noe som tilsier at humane myotuber kan skille ut IL-6 uavhengig av muskelkontraksjon (Yuan Z. Feng, upubliserte data). Dette kan forklare at kontrollmediene ga like god respons på glukoseoksidasjon som EPS-mediene fra etter trening. Da kondisjonerte medier produsert fra celler etter trening ga signifikant økt oksidasjon av glukose i forhold til kondisjonerte medier fra før trening tyder det på at de kondisjonerte mediene kan inneholde ulik mengde myokiner. Det kan tenkes at celler fra etter treningsintervensjonen skilte ut mer IL-6 i de kondisjonerte mediene, men dette blir bare spekulasjoner.

Cellene som produserte de kondisjonerte mediene ble stimulert med eller uten EPS i 48 timer. De kondisjonerte mediene ble samlet inn etter henholdsvis 24 og 48 timer. Videre ble mediene fortynnet i forholdet 1:1 med differensieringsmedium før tilsetning til myotubene. Dette medførte at en eventuell konsentrasjon av myokiner ble betraktelig lavere, noe som kan ha innvirkning på resultatet.

Det er tidligere gjort forsøk på skjelettmuskelceller med kondisjonert medium fra adipocytter. Adipocytter er i likhet med skjelettmuskel et endokrint organ og skiller ut adipokiner som har innvirkning på energimetabolismen i skjelettmuskel. I denne studien utført av Taube *et al.* ga behandling med kondisjonert medium effekt på opptaket av palmitinsyre. Fettsyretransportøren CD36 var oppregulert der hvor kondisjonert medium var tilsatt. Samtidig ga behandling med kondisjonert medium en nedsatt fosforylering av Akt ved insulin-stimulerte forhold [105].

4.7 Veien videre

I denne masteroppgaven er det gjennomført flere forsøk med et ulikt antall donorer. Det hadde vært spennende å studere cellenes responsivitet til EPS før og etter trening *in vivo* videre, da det i denne oppgaven kun ble tid til å undersøke to donorer. Det kunne vært ønskelig å gjøre westernblotting for p-IRS1 på nytt med et mer spesifikt antistoff som ga mindre bakgrunnsstøy. I tillegg kunne det vært interessant å måle IL-6 nivåene i de kondisjonerte mediene som ble benyttet i denne oppgaven. Siden IL-6 potensielt har flere mulige effekter på energimetabolismen i skjelettmuskel kunne disse nivåene blitt knyttet opp til resultatene fra substratoksidasjonsforsøkene. Samtidig kunne det vært interessant studere effekten av kondisjonerte medier på andre mediatorer i energimetabolismen. Siden forsøkene ble gjort med relativt få donorer, anbefales det å forske videre på problemstillingene ved å øke antall donorer.

5 Konklusjon

Resultatene i denne oppgaven viser at myotuber isolert fra biopsier tatt før og etter en 12 ukers treningsintervensjon ikke reflekterte den økte insulinfølsomheten som forsøkspersonene oppnådde etter treningsintervensjonen. Treningsintervensjon hadde effekt på styrke, utholdenhet og insulinfølsomhet *in vivo*. I myotuber isolert og dyrket fra biopsier tatt før og etter treningssintervensjonen var det kun en tendens til økning av insulin-indusert fosforylering av Akt i myotuber etter treningsintervensjonen, mens insulinstimulert glykogensyntese og fosforylering av IRS1 ikke var økt etter treningsintervensjonen. Det var heller ingen effekt av trening *in vivo* på proteinuttrykket av MHC-I i humane myotuber. Kondisjonerte medier produsert av myotuber fra etter trening ga signifikant økt glukoseoksidasjon, noe som tyder på at myotuber fra biopsier tatt etter treningsintervensjonen kan produsere andre faktorer eller andre nivåer av faktorer enn celler fra biopsier tatt før trening.

Trening *in vitro* kan også påvirke myotubene, EPS-stimulering av humane myotuber førte til økt ekspresjon av viktige gener involvert i energimetabolismen i skjelettmuskel. Nivåene av CPT1b var signifikant økt mens nivåene av IL-6 viste en tendens til økning etter EPS-stimulering sammenlignet med kontroll. Preliminære data kan også tyde på at cellenes responsivitet til EPS kan være endret etter trening *in vivo*.

Litteraturliste

1. World Health Organization. *Obesity and overweight*. 2015 [cited 2015 10. March]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Rang, H.P., et al., *Rang and Dales's Pharmacology*. 6th ed. 2007, London: Elsevier.
3. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglig retningslinjer: Forebygging, utredning og behandling av overvekt og fedme hos voksne*. 2010.
4. James, P.T., *Obesity: the worldwide epidemic*. Clin Dermatol, 2004. **22**(4): p. 276-80.
5. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok, *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*. 2013, Oslo: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.
6. Reseptregisteret. *Orlistat*. Søkt 27.03.2015]; Available from: <http://www.reseptregisteret.no>.
7. Hollung, K., et al., *Fettvevets betydning for utvikling av fedme og diabetes mellitus type 2*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2003.
8. Walker, R. and C. Whittlesea, *Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 4th ed. 2007, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone Elsevier.
9. Bosma, M., et al., *Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes, 2012. **61**(11): p. 2679-90.
10. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, *The endocrine function of adipose tissue: an update*. Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **64**(4): p. 355-65.
11. Eckel, R.H., S.M. Grundy, and P.Z. Zimmet, *The metabolic syndrome*. The Lancet. **365**(9468): p. 1415-1428.
12. Grundy, S.M., *Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(4): p. 295-309.
13. O'Neill, S. and L. O'Driscoll, *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. Obes Rev, 2015. **16**(1): p. 1-12.
14. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med, 2006. **23**(5): p. 469-80.
15. Helsedirektoratet, *Nasjonale faglige retningslinjer: Diabetes - Forebygging, diagnostikk og behandling*. 2009, Helsedirektoratet.
16. Cefalu, W.T., *Pharmacotherapy for the treatment of patients with type 2 diabetes mellitus: rationale and specific agents*. Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(5): p. 636-49.
17. World Health Organization. *Diabetes*. 2015 [cited 2015 22. January]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
18. Reseptregisteret. *Diabetesmidler*. Søkt 25.03.2015]; Available from: <http://www.reseptregisteret.no>.
19. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern*. Chem Biol, 2012. **19**(10): p. 1222-36.
20. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *International Diabetes Federation: a consensus on Type 2 diabetes prevention*. Diabet Med, 2007. **24**(5): p. 451-63.
21. Næss, O., *Sykdomslære og patologisk anatomi* 6th ed. 2012, Norway: Forlaget Vett & Viten.
22. Sand, O., Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Menneskets fysiologi*. 1st ed. 2001, Oslo, Norway: Gyldendal Norsk Forlag.
23. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
24. Guo, S., *Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms*. J Endocrinol, 2014. **220**(2): p. T1-t23.

25. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 85-96.
26. Jensen, J., et al., *The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise*. Frontiers in Physiology, 2011. **2**.
27. Lizcano, J.M. and D.R. Alessi, *The insulin signalling pathway*. Curr Biol, 2002. **12**(7): p. R236-8.
28. Shaw, L.M., *The insulin receptor substrate (IRS) proteins: at the intersection of metabolism and cancer*. Cell Cycle, 2011. **10**(11): p. 1750-6.
29. White, M.F., *Regulating insulin signaling and beta-cell function through IRS proteins*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(7): p. 725-37.
30. Long, Y.C., et al., *Insulin receptor substrates Irs1 and Irs2 coordinate skeletal muscle growth and metabolism via the Akt and AMPK pathways*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(3): p. 430-41.
31. Abdul-Ghani, M.A. and R.A. DeFronzo, *Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 476279.
32. Fatati, G., E. Mirri, and S. Coaccioli, *Effects of visceral fat accumulation in obesity and type 2 diabetes*. Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism, 2009. **2**(2): p. 111-118.
33. Racheek, L.I., *Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **121**: p. 267-92.
34. Krssak, M., et al., *Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study*. Diabetologia, 1999. **42**(1): p. 113-6.
35. Salvado, L., et al., *Targeting PPARbeta/delta for the treatment of type 2 diabetes mellitus*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(2): p. 209-23.
36. Aas, V., et al., *Are cultured human myotubes far from home?* Cell Tissue Res, 2013. **354**(3): p. 671-82.
37. Albers, P.H., et al., *Human muscle fiber type-specific insulin signaling: impact of obesity and type 2 diabetes*. Diabetes, 2015. **64**(2): p. 485-97.
38. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
39. Frontera, W.R. and J. Ochala, *Skeletal muscle: a brief review of structure and function*. Calcif Tissue Int, 2015. **96**(3): p. 183-95.
40. Egan, B. and Juleen R. Zierath, *Exercise Metabolism and the Molecular Regulation of Skeletal Muscle Adaptation*. Cell Metabolism, 2013. **17**(2): p. 162-184.
41. Holloszy, J.O. and E.F. Coyle, *Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences*. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984. **56**(4): p. 831-8.
42. Richter, E.A., et al., *Muscle Glucose Metabolism following Exercise in the Rat: INCREASED SENSITIVITY TO INSULIN*. Journal of Clinical Investigation, 1982. **69**(4): p. 785-793.
43. Santos, J.M., et al., *Skeletal muscle pathways of contraction-enhanced glucose uptake*. Int J Sports Med, 2008. **29**(10): p. 785-94.
44. Holmes, B. and G.L. Dohm, *Regulation of GLUT4 gene expression during exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2004. **36**(7): p. 1202-6.
45. Tarnopolsky, M.A., et al., *Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(3): p. R1271-8.

46. Dube, J.J., et al., *Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(5): p. E882-8.
47. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
48. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ*. Nat Rev Endocrinol, 2012. **8**(8): p. 457-65.
49. Nikolic, N., et al., *Electrical pulse stimulation of cultured human skeletal muscle cells as an in vitro model of exercise*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33203.
50. Pedersen, B.K. and M.A. Febbraio, *Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6*. Physiol Rev, 2008. **88**(4): p. 1379-406.
51. Pedersen, B.K., *Muscles and their myokines*. J Exp Biol, 2011. **214**(Pt 2): p. 337-46.
52. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Med Clin North Am, 2004. **88**(4): p. 787-835, ix.
53. Devaskar, S.U. and M.M. Mueckler, *The mammalian glucose transporters*. Pediatr Res, 1992. **31**(1): p. 1-13.
54. Richter, E.A. and M. Hargreaves, *Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake*. Physiol Rev, 2013. **93**(3): p. 993-1017.
55. Yang, J., *Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2014. **121**: p. 133-63.
56. Tremblay, F., M.J. Dubois, and A. Marette, *Regulation of GLUT4 traffic and function by insulin and contraction in skeletal muscle*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d1072-84.
57. Barnard, R.J. and J.F. Youngren, *Regulation of glucose transport in skeletal muscle*. Faseb j, 1992. **6**(14): p. 3238-44.
58. Ivy, J.L. and C.H. Kuo, *Regulation of GLUT4 protein and glycogen synthase during muscle glycogen synthesis after exercise*. Acta Physiol Scand, 1998. **162**(3): p. 295-304.
59. Alberts, B., et al., *Essential cell biology*. 3rd ed. 2009, New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
60. Ehrenborg, E. and A. Krook, *Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta*. Pharmacol Rev, 2009. **61**(3): p. 373-93.
61. Pilegaard, H. and P.D. Neufer, *Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise*. Proc Nutr Soc, 2004. **63**(2): p. 221-6.
62. Nielsen, J. and N. Ortenblad, *Physiological aspects of the subcellular localization of glycogen in skeletal muscle*. Appl Physiol Nutr Metab, 2013. **38**(2): p. 91-9.
63. Ivy, J.L., *Muscle glycogen synthesis before and after exercise*. Sports Med, 1991. **11**(1): p. 6-19.
64. Perseghin, G., et al., *Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects*. N Engl J Med, 1996. **335**(18): p. 1357-62.
65. Merry, T.L. and G.K. McConell, *Skeletal muscle glucose uptake during exercise: a focus on reactive oxygen species and nitric oxide signaling*. IUBMB Life, 2009. **61**(5): p. 479-84.
66. Dagenais, G.R., R.G. Tancredi, and K.L. Zierler, *Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm*. Journal of Clinical Investigation, 1976. **58**(2): p. 421-431.

67. Zhang, L., et al., *Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(1): p. 1-22.
68. Wang, H. and R.H. Eckel, *Lipoprotein lipase: from gene to obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(2): p. E271-88.
69. Koonen, D.P., et al., *Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1736**(3): p. 163-80.
70. Kerner, J. and C. Hoppel, *Fatty acid import into mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1486**(1): p. 1-17.
71. Thoresen, G.H., et al., *Metabolic switching of human skeletal muscle cells in vitro*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. **85**(5): p. 227-34.
72. Kelley, D.E., *Skeletal muscle fat oxidation: timing and flexibility are everything*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1699-702.
73. Ukropcova, B., et al., *Dynamic changes in fat oxidation in human primary myocytes mirror metabolic characteristics of the donor*. J Clin Invest, 2005. **115**(7): p. 1934-41.
74. Kelley, D.E. and L.J. Mandarino, *Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination*. Diabetes, 2000. **49**(5): p. 677-83.
75. Bourlier, V., et al., *Enhanced glucose metabolism is preserved in cultured primary myotubes from obese donors in response to exercise training*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(9): p. 3739-47.
76. Lund, J., *Vil trening in vivo prege skjelettmuskelceller in vitro?*, in Universitetet i Oslo. 2013.
77. Santa Cruz Biotechnology, I. *BCA Protein Assay Protocol*. 2010.
78. Technologies, A. *Agilent Total RNA Isolation Mini Kit Protocol*. 2005.
79. Wensaas, A.J., et al., *Cell-based multiwell assays for the detection of substrate accumulation and oxidation*. J Lipid Res, 2007. **48**(4): p. 961-7.
80. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
81. Wang, Q., et al., *Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(6): p. 4008-18.
82. Srivastava, A.K. and S.K. Pandey, *Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin*. Mol Cell Biochem, 1998. **182**(1-2): p. 135-41.
83. Wilson, J.M., et al., *The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting*. J Strength Cond Res, 2012. **26**(6): p. 1724-9.
84. Febbraio, M.A. and B.K. Pedersen, *Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ?* Exerc Sport Sci Rev, 2005. **33**(3): p. 114-9.
85. Coffey, V.G. and J.A. Hawley, *The molecular bases of training adaptation*. Sports Med, 2007. **37**(9): p. 737-63.
86. Al-Khalili, L., et al., *Insulin action in cultured human skeletal muscle cells during differentiation: assessment of cell surface GLUT4 and GLUT1 content*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(5): p. 991-8.
87. Gaster, M., et al., *The diabetic phenotype is conserved in myotubes established from diabetic subjects: evidence for primary defects in glucose transport and glycogen synthase activity*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 921-7.
88. Nehlin, J.O., et al., *Human myotubes from myoblast cultures undergoing senescence exhibit defects in glucose and lipid metabolism*. Biogerontology, 2011. **12**(4): p. 349-65.

89. Bonavaud, S., et al., *A discrepancy resolved: human satellite cells are not preprogrammed to fast and slow lineages*. Neuromuscul Disord, 2001. **11**(8): p. 747-52.
90. Pilegaard, H., et al., *Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(4): p. E806-14.
91. Lambernd, S., et al., *Contractile activity of human skeletal muscle cells prevents insulin resistance by inhibiting pro-inflammatory signalling pathways*. Diabetologia, 2012. **55**(4): p. 1128-39.
92. Ryan, A.S., et al., *Aerobic exercise plus weight loss improves insulin sensitivity and increases skeletal muscle glycogen synthase activity in older men*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2014. **69**(7): p. 790-8.
93. Stephens, F.B., et al., *Basal and insulin-stimulated pyruvate dehydrogenase complex activation, glycogen synthesis and metabolic gene expression in human skeletal muscle the day after a single bout of exercise*. Exp Physiol, 2010. **95**(7): p. 808-18.
94. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
95. Levinger, I., et al., *The effect of acute exercise on undercarboxylated osteocalcin and insulin sensitivity in obese men*. J Bone Miner Res, 2014. **29**(12): p. 2571-6.
96. Deldicque, L., et al., *Decrease in Akt/PKB signalling in human skeletal muscle by resistance exercise*. Eur J Appl Physiol, 2008. **104**(1): p. 57-65.
97. de Souza, E.O., et al., *The acute effects of strength, endurance and concurrent exercises on the Akt/mTOR/p70(S6K1) and AMPK signaling pathway responses in rat skeletal muscle*. Braz J Med Biol Res, 2013. **46**(4): p. 343-7.
98. Gorgani-Firuzjaee, S., et al., *Leukocyte antigen-related inhibition attenuates palmitate-induced insulin resistance in muscle cells*. J Endocrinol, 2012. **215**(1): p. 71-7.
99. Aas, V., et al., *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. Diabetologia, 2004. **47**(8): p. 1452-61.
100. Al-Khalili, L., et al., *Enhanced insulin-stimulated glycogen synthesis in response to insulin, metformin or rosiglitazone is associated with increased mRNA expression of GLUT4 and peroxisomal proliferator activator receptor gamma co-activator 1*. Diabetologia, 2005. **48**(6): p. 1173-9.
101. Fairchild, T.J., et al., *Glycogen synthesis in muscle fibers during active recovery from intense exercise*. Med Sci Sports Exerc, 2003. **35**(4): p. 595-602.
102. Burgomaster, K.A., et al., *Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(6): p. 1985-90.
103. Parra, J., et al., *The distribution of rest periods affects performance and adaptations of energy metabolism induced by high-intensity training in human muscle*. Acta Physiol Scand, 2000. **169**(2): p. 157-65.
104. Chesley, A., G.J. Heigenhauser, and L.L. Spriet, *Regulation of muscle glycogen phosphorylase activity following short-term endurance training*. Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 1): p. E328-35.
105. Taube, A., et al., *Adipokines promote lipotoxicity in human skeletal muscle cells*. Arch Physiol Biochem, 2012. **118**(3): p. 92-101.

Appendiks

1. Medier til celledyrking

1.1 Utsåingsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose

50 ml FCS (Føtalt kalveserum)

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amphotericin)

1.2 Proliferasjonsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose

10 ml FCS (Føtalt kalveserum)

10 ml Ultroser G

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amphotericin)

1.3 Differensieringsmedium

500 ml DMEM m/Glutamax m/1,0 g glukose

10 ml FCS (Føtalt kalveserum)

2,5 ml Pen/Strep 10 000 enheter/ml

2,5 ml Fungizone (250 µg/ml Amphotericin)

25 pmol insulin

2. Medier til Western

2.1 Høstebuffer

2x samplebuffer

10 µl/ml proteasehemmer

10 µl/ml fosfatasehemmercocktail 2

2.2 2x samplebuffer

12,5 ml 0,5 mol/l Tris-HCl pH 6,8

10 ml Glycerol

20 ml 10 % SDS

Tilsett 10 % β-merkaptoetanol og

5 % bromfenolblått

2.3 Elektroforesebuffer

25 mmol/l Tris

192 mmol/l Glycin

0,1 % (w/v) SDS

pH 8,3

2.4 Blottebuffer

25 mmol/l Tris

192 mmol/l Glycin

20 % Metanol (v/v)

pH 8,3

2.5 T-TBS (Tween-TBS)

10 mmol/l Tris

100 mmol/l NaCl

pH justeres til 7,5

0,05 % Tween 20

3. Medier til qPCR

3.1 Reaksjonsblanding

For hver prøve, totalt 20 µl i hvert rør:

13,2 µl DEPC-dH₂O + prøve

2,0 µl 10 x TaqMan RT buffer

0,8 µl 25 x dNTP mix

2,0 µl 10 x RT Random primers

1,0 µl RNase inhibitor (20 U/µl)

1,0 µl Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)

3.2 Standarder

cDNA-miks: 1,6 µl fra hver prøve

Standard 1000: 20 µl cDNA-miks + 80 µl nukleasefritt vann

Standard 200: 20 µl av Std. 1000 + 80 µl nukleasefritt vann

Standard 40: 20 µl av Std. 200 + 80 µl nukleasefritt vann

Standard 8: 20 µl av Std. 40 + 80 µl nukleasefritt vann

3.3 Fortynning primere

Utgangskonsentrasjon (stock) 300 µmol/l. Ønsket konsentrasjon 30 µmol/l. Fortynner 1:10.

10 µl primer + 90 µl nukleasefritt vann

3.4 Fortynning cDNA-prøve (1:5)

2,5 µl x 3 paralleller x 10 gener = 75 µl. Lager litt overskudd 78 µl.

Fortynnes 1:5 \square $78 \mu\text{l} / 5 = 15,6 \mu\text{l}$ cDNA + 62,4 µl nukleasefritt vann.

(Testet totalt 6 gener.)

3.5 SYBR Green PCR-miks

12,5 µl 2 x SYBR Green Master Mix

0,25 µl Primer F (Forward primer)

0,25 µl Primer R (Reverse primer)

9,5 µl DEPC-dH₂O

Totalt: 22,5 µl per prøve

4. Medier til substratoksidasjonsmetoden

4.1 Radioaktiv oljesyre

100 $\mu\text{mol/l}$ oljesyre:

48 μl [$1\text{-}^{14}\text{C}$]oljesyre (1 $\mu\text{Ci/ml}$)

65,6 μl Oljesyre

14,4 μl BSA

4,8 μl Karnitin

4,672 ml DPBS m/HEPES

Totalt 4,8 ml

4.2 Radioaktiv glukose

200 $\mu\text{mol/l}$ glukose:

27,84 μl D- $[^{14}\text{C}(\text{U})]$ glukose (0,58 $\mu\text{Ci/ml}$)

20 μl BSA

4,752 ml DPBS m/HEPES

Totalt 4,8 ml